

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Identificação Molecular e Perfil Sorológico de
Leptospira spp. Isolada de Gambás-de-Orelha-Branca
(*Didelphis albiventris*) no Sul do Brasil

Sérgio Jorge

Pelotas, 2009

SÉRGIO JORGE

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PERFIL SOROLÓGICO DE
LEPTOSPIRA SPP. ISOLADA DE GAMBÁS-DE-ORELHA-BRANCA
(*Didelphis albiventris*) NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Veterinária (área de conhecimento: Zoonoses e epidemiologia).

Orientador

Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod

Co-orientadora

Prof. Dr. Cláudia Pinho Hartleben Fernandes

Pelotas, 2009.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

J82

Jorge, Sérgio

Identificação molecular e perfil sorológico de *Leptospira spp.* isolada de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) no sul do Brasil / Sérgio Jorge ; orientador Claudiomar Soares Brod ; co-orientador Cláudia Pinho Hartleben. – Pelotas, 2009. – 56f. : tab. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de Concentração: Doenças infecciosas. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1.Zoonoses. 2.Leptospirose. 3.Animais silvestres.
4.Isolamento. 5.Diagnóstico sorológico. 6.Gambás-de-orelha-branca. 7.*Didelphis albiventris*. I.Brod, Claudiomar Soares.
II.Hartleben, Cláudia Pinho. III.Título.

CDD: 614.56

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Fabiana Kommeling Seixas, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Mário Carlos de Araújo Meirelles, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pelotas e a CAPES, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod, pela confiança e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Prof. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben Fernandes, pela amizade, competência e suporte.

À minha mãe, Maria de Lourdes, com gestos doces, simples e olhar gentil sempre se mostrou ser um exemplo de superação.

Ao meu pai Samir, (*in memoriam*), homem trabalhador, dedicado à família e cuja integridade serviu-me como base para construção de meus valores morais.

Aos meus irmãos, Margarete, Edson e Felipe, que sempre me ensinaram o verdadeiro sentimento de fraternidade e união.

Ao meu tio Luiz, pela presença e apoio.

A minha tia Idalina, cujo amor, carinho e generosidade estão expressos em seus gestos e palavras.

Ao meu namorado, Marco Medronha Filho, pela cumplicidade, apoio e afeto.

A Vera Machado, pelo incentivo para o ingresso no universo acadêmico.

A equipe do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre: Prof. Minello, Médica Veterinária Ana Paula, biólogos Marco Antonio, Rocene D'avila, Adriana Larrondo e a graduanda Marcela Pearson onde sempre se apresentaram de boa vontade e me mantiveram as portas abertas, sem as quais não seria possível a concretização deste projeto.

Aos professores do CCZ: Ana, Fernando, Marta e Alexandre, sempre cordiais, muito me foi ensinado.

Aos estagiários do CCZ, colaboradores na realização desta pesquisa.

Aos professores do Centro de Biotecnologia, Prof^a. Dr^a. Fabiana K. Seixas e Prof. Dr. Odir A. Dellagostin pelo apoio técnico e boa vontade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A Leptospirose.....	11
1.1.1 Agente etiológico, taxonomia e classificação.....	12
1.1.2 Biologia molecular.....	13
1.1.3 Modo de transmissão.....	13
1.1.4 Epidemiologia.....	14
1.1.5 Manifestações clínicas.....	15
1.1.6 Patogenia.....	15
1.1.7 Tratamento.....	16
1.2 Leptospirose e biologia de Didelfídeos e marsupiais	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. HIPÓTESE.....	21
4. ARTIGO “MOLECULAR IDENTIFICATION AND SEROLOGICAL TEST OF PATHOGENIC <i>LEPTOSPIRA</i> SPP ISOLATED FROM FREE-LIVING WHITE- EARED OPOSSUM (<i>DIDELPHIS ALBIVENTRIS</i>) IN SOUTH OF BRAZIL”.....	22
Abstrat.....	24
Introduction.	25
Material and methods.....	27
Results.....	30
Discussion.....	32

Acknowledgements.....	35
References.....	36
5 CONCLUSÃO GERAL.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO IBAMA - SISBIO	53

RESUMO

JORGE, Sérgio. **Identificação Molecular e Perfil Sorológico de *Leptospira spp.* Isolada de Gambás-de-Orelha-Branca (*Didelphis albiventris*) no Sul do Brasil.** 2009. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Leptospirose é uma antropozoonose de ocorrência mundial, particularmente nos países em desenvolvimento, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Várias espécies de marsupiais e didelfídeos são consideradas suscetíveis a infecção causada por uma grande variedade de sorovares patogênicos de *Leptospira spp.* tendo sido considerados possíveis hospedeiros deste agente. Neste trabalho foram coletadas amostras de soro e urina de 33 gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), capturados em diferentes regiões dos municípios do Capão do Leão e Pelotas, no sul do Brasil, com o objetivo de detectar anticorpos e isolar leptospiros. As amostras de soro foram testadas por aglutinação microscópica (MAT), utilizando 58 sorovares de *Leptospira spp.* e 1 de *Leptonema*. Para o isolamento, amostras de urina foram inoculadas em meio de cultura EMJH enriquecido com 10% de suplemento Difco®. Um sorovar patogênico foi obtido da urina, sendo o primeiro isolado do país para esta espécie, e foi caracterizado quanto ao gênero e patogenicidade por PCR utilizando primers para os genes 16S rDNA e *LipI32*. A técnica de seqüenciamento parcial do gene *rpoB* foi utilizada para identificar a espécie genômica. A cepa isolada pertence à espécie *L. borgpetersenii*, que juntamente com *L. interrogans* são as principais causadoras de doença em humanos. Anticorpos anti isolado de gambá foram avaliados em amostras sorológicas de 60 cães, 60 bovinos, 60 humanos e dos 33 gambás capturados através da MAT. Os soros humanos apresentaram reação de 3,3% (2/60), 28,33% (17/60) em soros caninos, 1,67% (1/60) em soros bovinos e 36,36% (12/33) em soros dos gambás capturados no estudo. Esses dados sugerem o envolvimento do

gambá-de-orelha-branca na manutenção de leptospiros no ambiente, uma vez que estando infectados por sorovares patogênicos podem eliminar o agente pela urina e infectar direta ou indiretamente animais domésticos e conseqüentemente o homem.

Palavras chave: Leptospirose, gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), zoonose, PCR, sequenciamento gene *rpoB*

ABSTRACT

JORGE, Sérgio. **Molecular Identification and Serological Profile of *Leptospira* spp. Isolated of White-Eared-Opossum (*Didelphis albiventris*) in South of Brazil.** 2009. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a zoonotic disease that occurs all over the world, particularly in developing countries, caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Several marsupial species are considered susceptible to infection caused by a wide variety of *Leptospira* serovars, acting as reservoirs. In this work were collected serum and urine samples of 33 White-eared opossum, trapped within distinct locations of Capão do Leão and Pelotas cities, in the South of Brazil, aiming to detect antibodies and to isolate leptospire. Serum samples were screened against a panel of 58 *Leptospira* spp and *Leptonema illini* serovars using the microscopic agglutination test (MAT). To attempt isolation, urine samples from all animals were inoculated in culture medium EMJH enriched with 10% of supplement Difco®. One pathogenic serovar was isolated after two months of inoculation, and is first isolate the country for this animal species and was characterized by PCR using primers for 16S and *LipI32* genes. The technique of partial sequencing of the *rpoB* gene was used to identify the genomic specie. The isolated strain belongs to the specie *L. borgpetersenii*, which along with *L. interrogans* are the main cause disease in humans. The isolate, was tested on MAT using dog, cattle and human sera. Cut off titer of 50 was used for domestic animal sera and 25 for human and opossum sera. Both human and animal sera presented agglutination on MAT to isolated strain corresponding to 3.3% (2/60), 28.33% (17/60) and 1.67% (1/60) in human, dog and cattle sera, respectively. The opossum sera presented 36.36% (12/33) of reaction. These findings suggest a probable white-eared opossum role in the maintenance of pathogenic *Leptospira* on the environment since low titer sera and urine elimination were observed. These

animals could be important reservoirs of *Leptospira* serovars for human and domestic animals.

Key words: Leptospirosis, White-eared opossum (*Didelphis albiventris*), zoonosis, PCR, *rpoB* sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Leptospirose

As espiroquetas constituem um grupo único de bactérias em termos de sua evolução, são agentes causadores da doença de Lyme, sífilis e leptospirose. (Cerqueira, 2009) A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial, transmitida ao homem através da água contaminada ou de exposição direta à urina de animais infectados (Bush, 1970; Levett 2001). O agente causador da leptospirose são bactérias do gênero *Leptospira*, onde estão inclusas espécies saprófitas e patogênicas (Levett, 2001). Ao atingirem a corrente circulatória as leptospiras multiplicam-se. A fase de bacteremia pode durar de 1 a 7 dias, e é concomitante com o aparecimento de sintomas como febre e dores musculares (Faine *et al*, 1999; Bharti *et al*, 2003). É uma doença de grande importância social e econômica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas e sua letalidade pode chegar em até 40% dos casos mais graves (Ministério da Saúde, 2002).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica com sério risco à saúde pública. A manutenção de leptospiras em regiões rurais e urbanas é favorecida pelo clima tropical associado a uma enorme população de roedores, acúmulo de lixo, excesso de cães errantes e crescimento desordenado dos centros urbanos (Ko *et al.*, 1999).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é baseado principalmente na detecção de anticorpos circulantes no sangue aproximadamente de 5 a 7 dias após o início dos sintomas. A técnica padrão de diagnóstico, chamada soroaglutinação microscópica (MAT), que pode ser realizada com antígenos vivos ou formolizados, e tem sido utilizada tanto em soros animais como de humanos (Faine, 1999; Levett, 2001).

1.1.1 Agente etiológico, taxonomia e classificação

As bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas aeróbicas obrigatórias, helicoidas flexíveis e espiraladas (Faine, 1994, Ministério da Saúde, 2002). Possuem dois filamentos axiais com inserções polares que estão localizados no espaço perimplasmático (Faine, 1994). O gênero *Leptospira* era dividido em mais de 300 sorovares pertencentes a duas espécies: *L. interrogans* sensu lato e *Leptospira biflexa* sensu lato, contendo as cepas patogênicas e saprófitas, respectivamente (Cerqueira, 2009), estas duas espécies eram classificadas baseado nas reações sorológicas. Posteriormente, as espécies de *Leptospira* foram classificadas por homologia no DNA, e, dentro de cada espécie, várias sorovares são reconhecidos (Quinn *et al*, 2005).

Nas diferentes espécies de *Leptospira*, encontram-se sorovares antigenicamente relacionados, que constituem os sorogrupos. Já foram descritos centenas de sorovares, distribuídos em 29 sorogrupos (Faine *et al.*, 1999) Isolados sorologicamente indistinguíveis podem pertencer a espécies totalmente diferentes, de acordo com a classificação genética (Feresu *et al.*, 1999; Brenner *et al.*, 1999). Os estudos das características genéticas têm conduzido a várias espécies dentro de *L. interrogans* lato sensu: *L. interrogans strictu sensu*; *L. santarosai*; *L. weilii*; *L. inadai*; *L. wolbachii*; *L. borgpetersenii*; *L. kirschneri*; *L. meyeri* e *L. noguchii* (Yasuda, 1987; Ramadass *et al.*, 1992), sendo que *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* são as principais responsáveis pela doença em humanos em todo o mundo (Dolhnikoff *et al.*, 2007; Isturiz *et al.*, 2006). A hibridização DNA-DNA é amplamente utilizada como padrão-ouro para a determinação da espécie em procariotos (Cerqueira, 2009). Os resultados da hibridização de DNA-DNA mostraram que no gênero *Leptospira* estão incluídas 20 espécies (Brenner *et al*, 1999)

Dentre os fatores ligados ao agente etiológico, favorecendo a persistência dos focos de leptospirose, especial destaque deve ser dado ao elevado grau de variação antigênica, à capacidade de sobrevivência no meio ambiente (até 180 dias) e à ampla variedade de animais susceptíveis que podem hospedar o microrganismo (Ministério da Saúde, 2002).

1.1.2 Biologia molecular

O genoma das leptospiros é de aproximadamente 5.000 kb de tamanho, com dois cromossomos; um com tamanho aproximado de 4.400 kb, e o outro de 350 kb (Xiao *et al.*, 1990; Zuerner, 1991; Ren *et al.*, 2003;).

A membrana externa de leptospiros contém LPS e várias lipoproteínas. As LPS são altamente imunogênicas e são responsáveis pela especificidade do sorovar (Chapman *et al.*, 1988).

Análises do perfil protéico indicam que a LipL32 é uma proteína predominante na membrana externa das *Leptospiras* (Zuerner *et al.*, 1991). A expressão de LipL32 é altamente conservada entre espécies de leptospiros patogênicas e está ausente em leptospiros não patogênicos. Além disso, LipL32 é expressa durante a infecção no hospedeiro, sendo altamente antigênica (Haake *et al.*, 2000).

Técnicas de amplificação e seqüenciamento do gene *rpoB*, tem sido utilizadas como um método de identificação de espiroquetas do gênero *Leptospira*, *Borrelia* e *Treponema*. Este gene codifica para a subunidade beta a enzima RNA-polimerase e é altamente conservado. A comprovada especificidade dos primers para o gene *rpoB* permite que apenas as espiroquetas sejam detectadas e identificadas quando ao gênero, mesmo quando uma amostra esteja contaminada por outras bactérias, (Renesto, 2000). A avaliação de uma seqüência parcial do *rpoB* como um marcador taxonômico, revelou que este gene tinha um maior número de sítios polimórficos em cepas de *Leptospira* de várias espécies, mais que o gene 16S *rRNA* (Cerqueira, 2009).

1.1.3 Modo de transmissão

Animais domésticos ou silvestres infectados por bactérias do gênero *Leptospira spp* podem eliminá-las pela urina, contaminando o meio ambiente, podendo infectar indiretamente o homem. O contato com água e lama contaminadas constitui um elo hídrico na transmissão da doença ao homem (Faine *et al.*, 1999).

A penetração do microrganismo dá-se através da pele lesada ou das mucosas da boca, narinas e olhos. Pode também ocorrer através da pele íntegra quando imersa em água por longo tempo. Outras modalidades de transmissão relatadas, porém

com pouca frequência: contato com sangue, tecidos e órgãos de animais infectados, e ingestão de água ou alimentos contaminados (Ministério da Saúde, 2002).

1.1.4 Epidemiologia

As fontes de infecção da leptospirose são constituídas pelos reservatórios e portadores (sadios, doentes e convalescentes) (Ministério da Saúde, 1995). Os roedores, de uma maneira geral, são importantes mantenedores da *Leptospira*, sua urina e o tecido renal com pH alcalino são favoráveis para a sobrevivência do microorganismo, permitindo uma colonização nos túbulos renais e eliminação urinária permanente com bactérias vivas (Fuhner, 1950; Edelweiss, 1962; Acha & Szyfres, 1986; Silva, 1998), porém nenhum mamífero silvestre pode ser excluído como possível hospedeiro (Hirsh & Zee, 2003). A caracterização de isolados de *Leptospira* é essencial para uma melhor compreensão das propriedades epidemiológicas da doença (Cerqueira, 2009).

O período de sobrevivência das leptospirosas, na água, varia segundo a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Sua multiplicação é ótima em pH compreendido entre 7,2 a 7,4 (Ministério da Saúde, 1995).

As taxas de incidência são mais significativas em países ou regiões de clima temperado (Levett, 1999; Faine *et al.*, 1999; Bharadwaj, 2004). No Brasil, é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda em condições inadequadas de saneamento e à alta população de roedores infectados (Ministério da Saúde, 2002).

Muitas sorovarietades estão associadas a uma espécie particular de hospedeiro de manutenção onde a doença é com frequência moderada ou subclínica e seguida por excreção prolongada de leptospirosas na urina. Os hospedeiros de manutenção são as principais fontes de contaminação ambiental e de transmissão natural para outras espécies animais, denominadas hospedeiros incidentais (Quinn, *et al.*, 2005).

O homem é considerado um hospedeiro final na disseminação da leptospirose e, ainda que prolongados períodos de leptospirose não sejam uma constante na leptospirose humana, o portador renal tem levado a raros exemplos de transmissão

inter-humana pela urina ou pelo contato sexual (Spinu, 1963; Szalka & Binder, 1974).

1.1.5 Manifestações clínicas

A leptospirose é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, desde febrículas e sintomas semelhantes à gripe, até a forma mais grave, a síndrome de Weil (Acha & Szyfres, 1986; Faine *et al.*, 1999). Em animais domésticos, a maioria das infecções por leptospirosas cursam com um quadro inaparente provavelmente em virtude de infecção por um sorotipo adaptado ao hospedeiro. Infecções clínicas que manifestam sinais evidentes são sobretudo decorrentes de sorovares não adaptados ao hospedeiro (Hirsh & Zee, 2003). Na fase septicêmica, os sintomas iniciam abruptamente com febre elevada, calafrios, cefaléia intensa e mialgia (Veronsi *et al.*, 1996).

A apresentação da forma leve da doença não impede que evolua para o quadro clínico grave. A incidência de qualquer sintoma, na maioria das vezes, depende da frequência com a qual as infecções leves são diagnosticadas. Se uma infecção leve não é diagnosticada, as incidências relativas dos sintomas graves podem parecer muito mais altas do que na realidade são (Faine, 1982).

Nas espécies silvestres, existe pouca informação, porém os sinais clínicos observados são semelhantes aos apresentados em espécies domésticas, como baixo índice de fertilidade, nascimento de crias debilitadas, abortos e transtornos oculares (Luna, *et al.*, 1996). Sinais clínicos observados na leptospirose em marsupiais incluem temperatura elevada, icterícia e hematúria (Wallach & Boever, 1983). Em primatas não humanos, a leptospirose provoca aborto ou natimortalidade, icterícia, convulsões e sangramento das mucosas (Klindlovits, 1999).

1.1.6 Patogenia

A patogenicidade da leptospirose está relacionada à virulência da sorovariedade infectante e à suscetibilidade das espécies de hospedeiros (Quinn *et al.*, 2005). As manifestações patológicas sugerem mecanismos tóxicos (Hirsh & Zee, 2003) com consideráveis danos ao endotélio vascular (Carter, 1988). Filtrados de líquidos teciduais de animais infectados experimentalmente contêm fatores citotóxicos (Hirsh & Zee, 2003). As primeiras lesões causadas pela bactéria ocorrem no endotélio de

pequenos vasos sanguíneos. A Isquemia localizada em alguns órgãos pode resultar em necrose dos túbulos renais, dano hepato-celular, meningite, miosite e placentite. Em casos graves, pode ocorrer hemorragia e icterícia, além de hepatomegalia e esplenomegalia. Há, geralmente, nos casos leves, moderada granulocitose e esplenomegalia (Pereira et al., 1998; Faine et al., 1999). Insuficiência e falência renal são as principais causas de morte (Faine et al, 1999). Em animais suscetíveis, danos às membranas das hemáceas e das células endoteliais, junto com lesão hepatocelular, produzem anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria e hemorragia associadas à leptospirose aguda (Quinn, et al, 2005).

Infecção experimental em saguis (*Callithrix jacchus*) com *Leptospira* sorovar Copenhageni apresentaram padrões microscópicos de lesões teciduais comparáveis aos observados em casos graves de leptospirose humana, incluindo hemorragia intra-alveolar (Pereira, 2005).

1.1.7 Tratamento

O tratamento da leptospirose depende da severidade e duração dos sintomas. As leptospirosas são susceptíveis a quase todos os antibióticos, exceto cloranfenicol e rifampicina (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

A droga de escolha para humanos é a penicilina G cristalina (adultos: de 6 a 12 milhões de unidades/dia, durante 7 a 10 dias; crianças: 50 mil a 100 mil unidades/kg/dia pelo mesmo período. Como alternativas podem ser utilizadas a ampicilina (4 g/dia para adultos e 50 a 100 mg/kg/dia para crianças), a tetraciclina (2 g/dia) ou a doxiciclina (100mg de 12/12horas) por igual período (Ministério da Saúde, 2002), porém as tetraciclinas são contra-indicadas em pacientes com insuficiência renal (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

Para o tratamento em animais domésticos, recomenda-se penicilina combinada com a estreptomicina (Carter, 1988). A estreptomicina pode ser combinada com ampicilina ou doses elevadas de penicilina G (Faine, et al 1999). O tratamento não terá nenhuma vantagem caso haja extensos danos renais. Altas doses de estreptomicina devem eliminar o estado portador. A tetraciclina e antibióticos macrolídeos são também efetivos (Carter, 1988).

Em gambás o tratamento pode incluir o a associação de penicilina e estreptomicina, por 10 dias, nas doses de 22.000 UI/kg e 22mg/kg, respectivamente. Outros antimicrobianos também podem ser usados (Wallach & Boever, 1983).

Casos moderados e graves, tanto para humanos ou em animais, devem ser iniciadas precocemente na tentativa de evitar complicações da doença, principalmente as renais. O acompanhamento do volume urinário e da função renal são fundamentais para se indicar a instalação de diálise peritoneal precoce, o que reduz o dano renal e a letalidade da doença (Ministério da Saúde, 2002).

1.2 Lepstopirose e biologia de Didelfídeos e Marsupiais

Levantamentos sorológicos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies sinantrópicas e silvestres das ordens Didelphimorfia e Rodentia, como potenciais disseminadores dos diferentes sorovares de *Leptospira* spp. (Santa Rosa *et al.*, 1975; Hartskeerl & Terpstra, 1996) Muitas espécies de animais silvestres atuam como reservatórios da leptospirose, eliminando um grande número de leptospiros em seus *habitats* (Faine *et al.*, 1999). Há pouca informação sobre a doença clínica em animais silvestres e estas foram obtidas principalmente a partir das observações realizadas em animais capturados (Durfee, 1979).

Algumas espécies são consideradas sinantrópicas por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes prejudicados pela ação do próprio homem. No meio urbano e rural, essas espécies podem, ocasionalmente, invadir as habitações humanas (Ministério da Saúde, 2002), podendo, desta forma, infectar direta ou indiretamente tanto outros animais como o homem (Gaio, 2007).

A transmissão de diferentes cepas de leptospiros ocorre diretamente entre espécies hospedeiras, através dos fluidos corporais, um animal transmite diretamente para outro (Faine, 1994). Anticorpos anti *Leptospira interrogans* sorovar balcanica foram identificados em marsupiais silvestres (*Trichosurus vulpecula*) introduzidos na Nova Zelândia, e a transmissão entre indivíduos da mesma espécie parece estar relacionada ao comportamento sexual na estação reprodutiva (Day *et al.*, 1998). Quando inoculadas, por via intraperitoneal, *Leptospira grippotyphosa* em gambás da espécie *Dideiphis marsupialis*, os mesmos não apresentaram sinais clínicos, contudo, observou-se a presença de leptospiremia, leptospiruria e

anticorpos homólogos contra o angente. Lesões atribuídas à infecção foram observadas no fígado e rins destes animais (Reilly, 1970).

Leptospiras isoladas das espécies *Didelphis marsupialis* e *Philander opossum*, habitando seu ambiente natural foi realizada no Peru, identificando seis novos sorovares sendo denominados como: huallaga, cepa M-7, sorogupo Djasiman; luis, cepa M-6, sorogruppo Tarassovi; machiguenga, cepa MMD-3, sorogruppo Icterohaemorrhagiae; rioja, cepa MR-12, sorogruppo Bataviae; rupa rupa, cepa M-3, sorogruppo Sejroe e tingomaria, cepa M-13, sorogruppo Cynopteri, sugerindo, portanto, a importância destes animais como fontes de infecção para a leptospirose humana e animais domésticos (Hidalgo & Sulzer, 1984).

Distribuída no continente americano, a ordem Didelphimorphia, atualmente, apresenta uma única família denominada Didelphidae. No Brasil são conhecidos em torno de 15 gêneros e 65 espécies. Os animais do gênero *Didelphis* são onívoros, sendo sua dieta composta de insetos, aves, ovos, pequenos mamíferos, frutas, sementes, folhas, répteis, anfíbios e moluscos, variando sazonalmente. A dieta dos animais mais jovens consiste principalmente de invertebrados, frutas e plantas, enquanto os indivíduos com mais idade alimentam-se também de pequenos vertebrados (Cordero & Nicolas, 1992).

Didelphis albiventris (Lund, 1841), conhecido popularmente como gambá-de-orelha-branca, saruê, raposa, sariquê ou micurê, é uma espécie de marsupial didelfídeo amplamente distribuída, incluindo o Brasil, o Paraguai, o Uruguai as regiões norte e central da Argentina e o sul da Bolívia (Lemos e Cerqueira, 2002). Podem ser encontrados em vários habitats, desde áreas abertas até montanhas e florestas decíduas e semidecíduas inclusive, em áreas urbanizadas. Os gambás-de-orelha-branca, são altamente capazes de se adaptarem às variações ambientais e frequentemente entram em contato direto ou indireto com o homem, tanto na zona rural quanto na urbana. Animais desta espécie, infectados por bactérias do gênero *Leptospira* spp podem eliminá-las, pela urina, contaminando o meio ambiente, podendo infectar os animais domésticos e/ou o homem. Amostras sorológicas de 34 gambás-de-orelha-branca testadas para leptospirose, pela técnica de soroaglutinação microscópica, testando 28 sorovares, 15 (44,12%) foram positivas para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. Destas, 13 (86,66%) foram positivas para o sorovar Patoc, sendo que 12 (92,30%) apresentaram título de 100 e 1 (7,69%) apresentou título de 200 (Gaio, 2007). Em estudo de prevalência realizado

no Rio Grande do Sul, a partir de 12 amostras de soro de gambás-de-orelha-branca, por meio da técnica MAT utilizando 54 sorovares, observou-se que em 75% das amostras foram encontrados baixos títulos de anticorpos, variando até no máximo 50 e 33% dos animais apresentaram títulos para pelo menos um sorovar patogênico (Bourcheidt *et al.*, 2003). Na Argentina, *Leptospira interrogans* canicola foi isolada dos rins de gambás-de-orelha-branca, e foram visualizadas nos tubulos contornados desses animais (Brihuega *et al.*, 2007).

Os animais sinantrópicos, são os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção. (Ministério da Saúde, 2002). O conhecimento da leptospirose na fauna silvestre é de grande importância para o controle e profilaxia da enfermidade nas espécies domésticas e também no homem (Sosa *et al.*, 1988).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar e caracterizar *Leptospira spp.* de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) na Região Sul do Estado do RS.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar leptospiras da urina de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) capturados na natureza ou recebidos no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre - Centro de Triagem de Animais Silvestres da UFPel (NURFS/CETAS).
- Determinar a frequência de reações na MAT contra a cepa isolada, e avaliação do aumento da sensibilidade da MAT, utilizando soros humanos, de animais domésticos, pertencentes ao banco de soros do Centro de Controle de Zoonoses – UFPel (CCZ/UFPel);
- Identificar a espécie genômica utilizando técnicas de caracterização molecular através do sequenciamento do gene *rpoB* bacteriano;
- Avaliar a virulência das cepas isoladas.

3. HIPÓTESE

Os gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) eliminam *Leptospiras* patogênicas em seu ambiente natural, e o isolamento de *Leptospira* de amostras de urina destes animais, a caracterização molecular e sua inclusão no diagnóstico sorológico de animais e humanos aumenta a sensibilidade da técnica de soroaglutinação microscópica (MAT).

2 ARTIGO

MOLECULAR IDENTIFICATION AND SEROLOGICAL TEST OF PATHOGENIC *Leptospira spp* ISOLATED FROM FREE-LIVING WHITE-EARED OPOSSUM (*Didelphis albiventris*) IN SOUTH OF BRAZIL

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Wildlife Disease

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND SEROLOGICAL TEST OF
PATHOGENIC *Leptospira spp* ISOLATED FROM FREE-LIVING
WHITE-EARED OPOSSUM (*Didelphis albiventris*) IN SOUTH OF BRAZIL**

Authors: Sérgio Jorge^a, Cláudia P. Hartleben^a, Fabiana K. Seixas^b, Ana Paula N. Albano^c, Marco A. A. Coimbra^c, Cledir B. Stark^a, Adriana G. Larrondo^c, Marta G. Amaral^b, Odir A. Dellagostin^b, Luiz F. Minello^c, Claudiomar S. Brod^a

Affiliations:

^aCentro de Controle de Zoonoses, ^bCentro de Biotecnologia and ^cNúcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre
Universidade Federal de Pelotas,
96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author:

Claudiomar Soares Brod
Centro de Controle de Zoonoses
Universidade Federal de Pelotas.
Caixa Postal 354,
96010-900, Pelotas, RS, Brazil
Phone: +55 53 32757424
E-mail: claudiomarbrod@yahoo.com.br

ABSTRACT: Leptospirosis is a zoonotic disease that occurs all over the world caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Pathogenic serovars of *Leptospira* have a wide antigenic diversity attributed mainly to the lipopolysaccharide present in the outer membrane. Several marsupials species are considered as susceptible to infection caused by a wide variety of *Leptospira* serovars for which they serve as hosts. To investigate the epidemiological role of *Didelphis albiventris* as maintenance hosts of *Leptospira*, serum and urine samples from 33 White-eared opossum (*Didelphis albiventris*), captured within different regions in Capão do Leão and Pelotas cities, in South of Brazil, were sera blood screened against a panel of 58 *Leptospira* spp and *Leptonema illini* strains using the microscopic agglutination test (MAT). For *Leptospira* isolation, urine samples of these animals were inoculated in EMJH medium enriched with 10% Difco® supplement. One pathogenic serovar was isolated after two months of inoculation. The new *Leptospira* strain isolate was identified by PCR for *LipI32* and 16S rDNA genes and *rpoB* parcial sequencing. The result of *rpoB* gene sequencing showed that the isolated strain belong to genomic specie *L. borgpetersenii*. MAT was performed to identify antibodies against this new serovar on serum samples from 60 dogs, 60 cattle, 60 human and 33 opossum. The results of agglutination reaction for Opossum isolate were 3,3% (2/60), 30,0% (18/60), 1,67% (1/60) for human, dogs and cattle respectively and 36,36% (12/33) on opossum serum. Opossum isolate improved MAT sensitivity compared to MAT performed other serovars on dog species. Moreover, when this strain was used alone reacted with 52.94% of the positives serum and when associated to serovar canicola was possible to identify 80.0% (24/30) of the true positives to the MAT plus 13.33% (4/30) of the false negatives at MAT with 59 others serovars. These findings suggest a probable white-eared opossum role in the maintenance of pathogenic *Leptospira*

on the environment. These animals could be important reservoirs of pathogenic *Leptospira* and infect directly and indirectly domestic animals and human.

Key words: *Leptospira*; serology; isolation; White-eared opossum

INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonosis, usually transmitted to humans through contaminated water or direct exposure to the urine of infected animals (Busch, 1970; Levett, 2001). The causative agent of leptospirosis belongs to the genus *Leptospira*, which contains both saprophytic and pathogenic species (Levett, 2001).

Many domestic and wild mammals have been found to be either natural reservoirs or accidental hosts for leptospires of various serotypes (Glosser, 1974). Transmission of different types of leptospirosis in maintenance host species usually occurs directly, when body fluids from an infected animal pass directly to another animal (Faine, 1994). The presence of *Leptospira*-infected wildlife and domesticated animals poses a persistent public health threat. *Leptospira* usually gain access to new hosts by passage across mucous membranes or through skin abrasions, often from environmental sources, such as urine-contaminated water (Zuerner & Alt, 2009). What little information there is on clinical leptospirosis in feral animals has been gathered mainly from observations on captured animals (Faine *et al*, 1999). The reservoirs do not display any clinical signs, concerning species shedding leptospires into efficient epidemiological reservoirs of leptospires (Levett, 2001).

The same species of animals inhabiting distinct ecological niches in different countries may represent different type-ecosystems for specific leptospiral serovars (Hathaway, 1981). The White eared-opossum (*Didelphis albiventris*) is a marsupial's

species highly capable of adapting to environmental variations, often come in direct or indirect contact with man, both in rural as in urban areas. Thus, serological surveys on these animal populations in different ecosystems are important for the knowledge of these animals potential in leptospirosis transmission (Gaio, 2007).

Pathogenic *Leptospira* spp., previously classified into the single species *Leptospira interrogans*, are now differentiated into at least 12 species, with *L. interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* being the main causes of human disease worldwide (Vivian, 2009). Based on serological criteria, strains of *Leptospira* are differentiated into serovars, which represent the basic taxon. Serovars that are antigenically related are placed into serogroups what are of clinical and epidemiological importance but for definitive identification of the isolates of *Leptospira* strains requires the use of serological and molecular techniques (Levett, 2001). Evaluation of a partial *rpoB* gene sequence as a taxonomic marker revealed that this gene had a larger number of polymorphic sites, in *Leptospira* strain from various species, than the 16S *rRNA* gene (La Scola, et al, 2006). The characterization of *Leptospira* isolates is also essential for a better understanding of the epidemiological properties of the disease (Cerqueira, 2009).

In this study, 33 White-eared opossum were captured in south of Brazil, and from those were collected blood and urine samples. From that specimen it was possible to isolate one serovar of *Leptospira*, and is first isolate the country for this animal species and was molecular identified by PCR and *rpoB* gene sequencing. and inoculated in hamsters for assessment of histological lesion. The new *Leptospira* strain was used in serological survey carried out on serum samples from cattle, dogs, human and captured opossum by microscopic agglutination test (MAT).

MATERIAL AND METHODS

Captured of Animals and Specimen Collection

Thirty-three White-eared opossum were captured between December 2007 and August 2008 from Capão do Leão (31°48"S, 52°24"O) and Pelotas city (31°46"S, 52°20"O) in state of Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were transported to the *Centro de Triagem de Animais Silvestres of Universidade Federal de Pelotas* for anesthetic and diuretic administration. Blood was collected by cardiac puncture, centrifuged and serum storage at -20 C until use. Urine samples were collected by bladder puncture. An anesthetic solution containing tiletamina e zolazepam (Zoetil®) was used to handling of animals. The chemical restraint of animals studied was performed according to protocols previously described for anesthetic (Pachaly & Brito, 2000). The procedures used in the present study were approved by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), authorization for scientific activities number 13755-1. After specimen collection procedures, the animals were maintaining under the observation for four days, received water and food and then were released in the same place of capture.

Isolation of Leptospires

Urine samples obtained by bladder puncture were carried on to inoculation on culture media. Five hundred micro liters were inoculated in culture tubes containing EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson Harris) medium enriched with 10% *Leptospira* enrichment Difco® in dilutions 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} . The cultures were incubated at 30° C and examined weekly by dark field microscopy and were checked once a week over 2-4 months.

Dark Field Microscopy on Blood and urine

For attempt to identify spirochetes on blood and urine, dark field examination was used, and 5 µL of each specimen obtained from each animal capture was applied on a glass slide, cover with a cover glass, and carried on under microscopy.

PCR and Partial *rpoB* gene sequencing

The partial *rpoB* was amplified and sequenced using primers previously described (La Scola, 2006), based on the alignment of previously determined *rpoB* of three *Leptospira* strains, designated and tested a primer pair that enabled us to amplify and sequence a 600 bp segment of *Leptospira rpoB*. The pair included Lept 1900f (CCTCATGGGTTCCAACATGCA) and Lept 2500r (CGCATCCTCRAAGTTGTAWCCTT). Fragments were amplified with one cycle at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 30 sec, 51°C for 30 sec, 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 7 min. Furthermore, the 16S rDNA gene and *lipL32* gene was amplified to demonstrate genus and that the isolate is pathogenic *Leptospira* (Haake et al., 2000). For *lipL32* amplification, PCR primers lipL32 F: 5' CGC TTG TGG TGC TTT CGG TGG T 3' and lipL32 R: 5' CTC ACC GAT TTC GCC TGT TGG G 3' were used, resulting in a 264 bp amplicon of the lipL32 coding region.

Aliquots were evaluated by agarose gel electrophoresis. Before the sequencing step, PCR products were purified by the use of GFX PCR DNA and Gel Band purification kit according to manufacturer instructions (GE Healthcare). The sequencing was performed in a MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare) by the use of the Dynamic ET-terminator technology. Chromatograms were assembled and analyzed using ContigExpress® module of Vector NTI 10.0 suite (Invitrogen).

The assembled sequence was submitted to BLAST alignment (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) against other *rpoB* sequences available in GenBank.

Microscopic Agglutination Test (MAT)

The microscopic agglutination test (MAT) was carried on to detected presence of leptospiral antibodies against the isolate in sera samples (Faine, 1982). Cut off titers were 100 for domestic animals and 25 for human and opossum. Agglutination of 50% or more of the leptospires constituted a positive reaction. Positive tests were reported as greatest serum dilution at which serum showed a reaction. Human and animal sera samples used were randomly selected from bank sera of Centro de Controle de Zoonoses (Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas). Sixty serum samples, 30 negative and 30 positive on MAT were selected from cattle, dogs and human with a total of 180 serum samples. Also, thirty three serum samples of White-eared opossum captured were tested for antibodies against *Leptospira*. All serum samples were tested with the antigen collection of 59 serovars plus opossum isolate listed in table 1.

Inoculation of hamster with isolated *Leptospira*

The *Leptospira* isolated was growing in EMJH medium and 10^8 bacterial cells were inoculated intraperitoneally in 4 Male Golden Syrian hamsters. The survived animals were euthanized after 21 days for tissues collection. For histopathological studies, lung, liver and kidney tissue samples were fixed in 10% formalin (pH 7.0), and then embedded in paraffin. Six sections of 5 - 6- μ m thickness from each organ were stained with hematoxylin and eosin.

Male Golden Syrian hamsters used in this experiment were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas (UFPeL). The experimental animals were housed at the animal facility of the Centro de Biotecnologia, UFPeL, and maintained in accordance with the guidelines of the Ethics Committee in Animal Experimentation of the UFPeL throughout the experimental period.

Statistical analysis

The program *EpiInfo* 6.03 CDC (DEAN et al., 1996), was used for all statistical analyses.

RESULTS

Isolation of leptospires and Dark Field Microscopy on Blood and Urine

One serovar was obtained from one animal from 33 urine samples of White-eared-opossum, the urine culture has been better growth in the dilution 10^{-2} after 2 months of incubation. In dark field microscopy were visualized spirochetes on 12 blood samples. It was observed spirochetes in 2 urine samples. Spirochetes was no visualized in urine and blood samples from opossum reservoir of Opossum isolate serovar.

***Leptospira* molecular identification by PCR and *rpoB* gene sequencing**

The isolate was identified belonging to genus *Leptospira* by amplification since a band of 264 bp was amplified using *lip*/32 primers (Figure 1). The amplified PCR products of partial *rpoB* gene were sequenced in order to perform the taxonomic classification of isolate. PCR product of approximately 600bp for *rpoB* gene were amplified and sequenced with the primers mentioned above. The *rpoB*

sequences were then used to perform a BLAST global comparative analysis. These analyses demonstrate 100% identity with *L. borgpetersinii*.

Microscopic Agglutination Test (MAT)

MAT was carried on to detected presence of leptospiral antibodies against the isolate in animal and human sera samples. The samples of human, cattle, dog and opossum showed agglutination reaction for Opossum isolate with percents of 3.3%, 1.67%, 30.0% and 36.36% respectively and for all species of 15.49%. The statistical analysis identified the usefulness of Opossum isolated used alone for canine leptospirosis diagnosis ($p=0.004$) and with lower significance for other species (Table 2). MAT titers in human, cattle and canine sera are showed in table 3, ranging of 100 to 3,200. Serological analyses of Opossum isolate using the 213 sera samples are showed in table 4. MAT using Opossum isolate identified antibodies in sera samples on primary negative MAT round and reached higher antibodies titers.

MAT reactions of dog sera using the isolate alone has been able to detected 52.94% of positive samples when compare with the other all serovars collection used on MAT (Table 5). Moreover, MAT using Opossum isolate associated with six other serovars, including four local isolates were able to detected alone 100 % of positive canine sera ($p<0.05$) as showed in Table 5. Opossum isolate together with serovar canicola has been 82.35% of sensitivity on MAT to dog species diagnosis ($p<0.0001$) as showed in table 6.

Necropsy and histological examination

Leptospira isolate from Opossum was virulent for hamster model since all animals developed acute lethal infection characterized by hepatic, renal and

pulmonary complications. Macroscopic pulmonary and widespread bleeding was observed. Microscopic foci of alveolar hemorrhage were observed in all animals inoculated with the isolate. Renal, hepatic and pulmonary tissues presented infiltration with lymphocytes cells. Pyknosis was observed on renal tubules cells (Figure 2). None of these features were seen in health control animals.

DISCUSSION

Leptospirosis has a very important role of the maintenance host, which ensures the perpetuation of the organism in the environment. Among mammals, like marsupials, are responsible for maintaining *Leptospira* in environment (Levett, 2001). During an outbreak, could be involved several domestic and wild animal species living in biocenosis and the transmission occurs through direct contact with urine containing *Leptospira*.

Indirect transmission of leptospirosis also may occur occasionally between maintenance hosts or from maintenance hosts to other species, as a result of contact with environments containing infected urine (Faine, 1999).

Since each serovar is usually associated with a particular host, identification of serovars is essential to epidemiological studies and strategies for prevention (Faine, 1999). In this work we report on a *Leptospira* strain obtained from White-eared opossum. This is the first isolate obtained from opossum in Brazil. Isolates from this animal species was reported in Latin America, however, molecular characterization of that isolate was reported as *L.interrogans*, serovar canicola (Brihuega *et al.*, 2007). In attempt to identify bacterial genus of the isolate and pathogenic characteristic were used two set of primers for *RNA16S* and *lip132* partial genes amplification. For species characterization of the isolate the partial *rpoB* gene sequencing approach

was used. The usefulness of partial *rpoB* gene sequencing was demonstrated for several bacterial species including genus spirochetes (Renesto *et al.*, 2000). The pathogenic *Leptospira* isolate described in this work belongs to *L. borgpetersenii*.

In this study, White-eared opossums showed low antibodies titers on MAT. Low titers of antibodies has been reported for this specie (Bourscheidt,*et al.*, 2003) that could be attributed to moderately susceptible to infection (Babudieri, 1958) a characteristic of reservoirs (Faine, 1999). These findings suggest that probably white-eared opossum may be infected by the *Leptospira* serovars and eliminate by urine and infect people indirectly and domestic animals.

Low MAT titers were observed in human sera probably by two reasons: firstly, human invade different ecosystems that could contain unknown leptospiral strains probably no present in bacterial collection for leptospirosis diagnosis by MAT. Secondly, human population normally has medical care on the bacterial disease beginning and antibodies could be not detected on this disease stage (Brod *et al.*, 2005).

To investigate the Opossum isolate virulence it was inoculated in hamster model. Lesions attributed to serovar isolated were observed in liver, lung and kidney tissue of hamster model. Renal lesions consisted of a mild glomerulitis with an occasional focus of interstitial nephritis. Hemorrhage in lung was observed. The isolate was virulent and one hamster inoculated death at six day pos inoculation, the other hamsters were euthanized at 21 days. All animals had lesion and its virulence for mammals was confirmed.

An experiment conducted previously, opossums of the genus *Didelphis* were experimentally inoculated intraperitoneally with *Leptospira grippotyphosa*, clinical signs were not detected. However, leptospiremia, leptospiruria and antibodies for

homologous organism were detected at titers of 100 in one animal of each group on 28 days pos inoculation, and lesions attributed to leptospirosis were observed in liver and kidney tissue (Reilly, 1970).

Opossum reservoir characteristic is showed in table 4. From 33 opossum blood samples tested on MAT, 10 samples presented title of 25 and 2 with 50.

The *Leptospira* strain isolated was applied on MAT with animal and human sera samples to investigate the presence of antibodies against the opossum isolate. The inclusion of serovars isolated from leptospirosis case area of occurrence is recommended by international leptospirosis society (ILS, 2005) to increase MAT sensitivity (Levett, 2001). Opossum isolate showed cross reactivity with all sera tested with percents ranging from 1.67% to 36.36%. The statistical significance detected for canine specie ($p=0.004$) is an evidence of the Opossum isolate serovar prevalence in the ecosystem, since were identified an apparent prevalence of 30 %, sensitivity of 46.67%, specificity of 86.67%, predictive value of 77.78% and accuracy of 66.67% as showed in table 2.

For leptospirosis diagnosis using MAT is recommended the presence of the major pathogenic serogroups on the bacterial collection (Faine, 1999) and the use of common serovars from leptospirosis cases occurrence (Torten et al., 1979). In this study we used a bacterial collection of 59 *Leptospira* on MAT and Opossum isolate inclusion enhanced test sensitivity in six per cent in canine diagnosis. Brod et al., 2005, reported 20 per cent of MAT sensitivity enhanced when a new serovar, isolate from canine, was included on MAT. When Opossum isolate was included in MAT bacterial collection for human diagnosis it was observed higher titles when compare with routine serovars used on MAT and positive reactions in 4 sera samples that

were negative (Table 4). However, in cattle sera only one MAT reaction occurred with title of 100.

MAT reactions of dog sera using Opossum isolate alone has been able to detected 52.94% of positive samples when compare with the other all serovars collection used on MAT (Table 5) with title ranging of 100 to 3200 (Table 3). The high titles suggest that dogs infection could be by this *Leptospira* strain. Opossum isolate together with serovar canicola has been 82.35% of sensitivity on MAT to dog species diagnosis ($p < 0.0001$) as showed in table 7. In conclusion, this findings contributed with knowledge of the epidemiology of *Leptospira* in rural and peri urban area with identification of opossum as a probably *Leptospira* host reservoirs of *L. borgpetersenii* and the use of Opossum isolate strain could be useful to increase MAT sensitivity carried on dog sera.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES Foundation (Brazilian Government). The authors would like to thank for all help in our experiments: NURFS/CETAS, Centro de Biotecnologia, Centro de Controle de Zoonoses (UFPEL) e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

REFERENCES

- BABUDIERI B. 1958. Animal reservoirs of leptospires. *Ann N Y Acad Sci.* 3;70(3):393–413.
- BOURSCHEIDT, D.; SILVA, E. F.; SEYFFERT, N.; RECUERO, A. L .C.. ; FOSTER, K. M.; MICHELS, G. H.; LANGONE, P. Q.; ANTUNES, G. M. AND BROD, C. S. 2003. Sorologia para a Leptospirose em Gambá (*Didelphis albiventris*). XII CIC - V ENPOS, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas Brazil.
- BRIHUEGA, B.; PAVÁN, , M. ; CAIRÓ, F; VENZANO, A. ; AUTERI, C.; FUNES, D. ; ROMERO, G. AND SAMARTINO, L. 2007. *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). *Revista Argentina de Microbiología* 39: 19.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R. AND DELLAGOSTIN, O .A. 2005. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (4): 294-300.
- BUSCH, L. A. 1970 Epizootiology and Epidemiology of Leptospirosis. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 6.
- CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M.; A century of *Leptospira* strain typing. 2009 *Infection, Genetics and Evolution*..
- DEAN, A. G; DEAN J. A. AND COULOMBIER, D. 1996.. *Epi Info™*, Version 6.04a, a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.
- FAINE, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization Offset Publication. Geneva.
- FAINE, S. 1994. *Leptospira* and Leptospirosis. CRC Press. Boca Raton, Fla. USA.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A. AND PEROLAT, P. 1999 *Leptospira* and Leptospirosis, MediSci, Melbourne, Austrália,
- GAIO, F. C.; FACCIOLI, P. Y.; FORNAZARI, F. AND LANGONI, H. 2007 Anticorpos anti-leptospíricos e anti-*Toxoplasma gondii*, em gambás (*Didelphis albiventris*). XXXI Congresso Annual da Sociedade de Zoológicos do Brasil, XIV Congresso Annual da “Asociación Latinoamericana de parques zoológicos e acúarios”; XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São Paulo, Brazil
- GLOSSER, J. W.; SULZER, C. R.; EBERHARDT, M. AND WINKLER, W. G.; 1974. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype *Tarassovi* linection in turtle. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 10.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N. AND BOLIN, C. A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.*, v.68, n.4, p.2276-2285.

HATHAWAY, S. C.; BLACKMORE, D. K. AND MARSHALL, R. B. 1981. Leptospirosis in free-living species in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 17. Nº 4.

INTERNANIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY. 2005. <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.htm>

LA SCOLA, B.; BUI, L.T.; BARANTON, G.; KHAMIS, A. AND RAOULT, D. 2006 Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Lett.* 263 p.142–147.

LEVETT, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.2, p.296-326.

PACHALY, J. R. AND BRITO H. F. V. 2000. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. *Revista Veterinária*, v.118, n.2, p.59-65.

REILLY, J. R. 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 6.

RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M. AND RAOULT, D. *rpoB* Gene Analysis as a Novel Strategy for Identification of Spirochetes from the Genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *Journal of Clinical Microbiology*, Jp. 2200–2203

TORTEN, M. Leptospirosis. *In: STOENNER, H. E ; TORTEN M. AND KAPLAN, W.* 1979. CRC handbook series in zoonoses, section A: bacterial, rickettsial and mycotic diseases, CRC Press, Boca Raton, Flórida, vol. I, p. 363-420,

VIVIAN, J. P.; BEDDOE, T.; MCALISTER A. D.; WILCE, M. C. J.; ZAKER-TABRIZI, L.; TROY, S.; BYRES, E. ; HOKE, D. E.; CULLEN, P. A.; LO, M.; MURRAY, G.; ADLER, B. AND ROSSJOHN, J. 2009. Crystal Structure of LipL32, the Most Abundant Surface Protein of Pathogenic *Leptospira* spp. *J. Mol. Biol.*

ZUERNER, R. L. AND ALT D. P. 2009. Variable Nucleotide Tandem Repeat Analysis 1 Reveals a Unique Group of 2 *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Isolates Associated with 3 California Sea Lions. *J. Clin. Microbiol.*

Table 1: Serovars used in agglutination microscopic test

Serogroup	Serovar	Strain	Genomic specie
<i>Australis</i>	1. australis	Ballico	<i>L. interrogans</i>
<i>Australis</i>	2. bratislava	Jez Bratislava	<i>L. interrogans</i>
<i>Autumnalis</i>	3. autumnalis	Akiyami A	<i>L. interrogans</i>
<i>Autumnalis</i>	4. rachmati	Rachmat	<i>L. interrogans</i>
<i>Autumnalis</i>	5. butembo	Butembo	<i>L. kirshneri</i>
<i>Ballum</i>	6. castellonis	Castellon	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Ballum</i>	7. ballum	Mus 127	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Bataviae</i>	8. bataviae	Van Tienem	<i>L. interrogans</i>
<i>Bataviae</i>	9. bataviae	Swart	<i>L. interrogans</i>
<i>Canicola</i>	10. canicola	Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>
<i>Celledoni</i>	11. withcombi	Withcombi	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Celledoni</i>	12. celledoni	Celledoni	<i>L. weillii</i>
<i>Cynopteri</i>	13. cynopteri	3522C	<i>L. kirshneri</i>
<i>Grippotyphosa</i>	14. grippotyphosa	Moskva IV	<i>L. kirshneri</i>
<i>Grippotyphosa</i>	15. grippotyphosa	Duyster	<i>L. kirshneri</i>
<i>Grippotyphosa</i>	16. grippotyphosa	Mandemakers	<i>L. kirshneri</i>
<i>Hebdomadis</i>	17. hebdomadis	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	18. copenhageni	M 20	<i>L. interrogans</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	19. icterohaemorrhagiae	3294	
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	20. icterohaemorrhagiae	RGA	<i>L. interrogans</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	21. copenhageni	Winjberg	<i>L. interrogans</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	22. icterohaemorrhagiae	Kantorovic	
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	23. icterohaemorrhagiae	Verdum	
<i>Javanica</i>	24. javanica	Veldrat Batavia 46	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Javanica</i>	25. poi	Poi	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Panama</i>	26. panama	CZ 214 K	<i>L. noguchii</i>
<i>Pomona</i>	27. pomona	Pomona	<i>L. Interrogans</i>
<i>Pomona</i>	28. proechimys	1161 U	<i>L. Interrogans</i>
<i>Pyrogenes</i>	29. pyrogenes	Salinem	<i>L. Interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	30. saxkoebing	Mus 24	<i>L. Interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	31. wolffi	3705	<i>L. Interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	32. hardjo	Hardjoprajitno	<i>L. Interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	33. sejroe	M 84	<i>L. interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	34. hardjo	Lely 607	<i>L. interrogans</i>
<i>Shermani</i>	35. shermani	1342 K	<i>L. santarosai</i>
<i>Tarassovi</i>	36. tarassovi	Prelepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Andamana</i>	37. andamana	CH 11	<i>L. biflexa</i>
<i>Andamana</i>	38. andamana	Bovedo	<i>L. biflexa</i>
<i>Semarang</i>	39. patoc	Patoc I	<i>L. biflexa</i>
<i>Semarang</i>	40. semarang	Veldrat Semarang 173	<i>L. meyeri</i>
<i>Djasiman</i>	41. sentot	Sentot 90 C	<i>L. interrogans</i>
<i>Djasiman</i>	42. djasiman	Djasiman	<i>L. interrogans</i>
<i>Mini</i>	43. mini	Sari	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>Illini</i>	44. Illini	3055	<i>Leptonema Illini</i>
<i>Doberdo</i>	45. rufino	RPE	
<i>Autumnalis**</i>	46. bonito*	CCZ-380	<i>L. interrogans</i>
<i>Canicola</i>	47. kito*	CCZ-89	<i>L. interrogans</i>
<i>Canicola</i>	48. tande*	CCZ-463	<i>L. interrogans</i>
	49. ike*	CCZ-27	<i>L. interrogans</i>
	50. mike*	CCZ-90	<i>L. interrogans</i>
	51. kade*	CCZ-69	<i>L. interrogans</i>
<i>Autumnalis</i>	52. caco*	CCZ-81	<i>L. noguchii</i>
<i>Djasiman</i>	53. isoton*	CCZ-359	
<i>Bataviae</i>	54. cascata*	CCZ-206	<i>L. noguchii</i>
<i>Australis**</i>	55. hook*	CCZ-66	<i>L. noguchii</i>
<i>Australis</i>	56. skoll*	CCZ-55	<i>L. interrogans</i>
	57. picanha*	CCZ-49	
	58. cau*	CCZ-42	<i>L. borgpetersenii</i>
	59. gig*	CCZ-45	<i>L. interrogans</i>

*local isolates; ** GeneBank under accession n^{os}. EU349497-EU349505.

Table 2. Microscopic Agglutination test using Opossum isolate

Species	MAT		Prev.	p	Odds ratio (IC*95%)	S _e	S _p	P _{pv}	P _{nv}	A
	Pos.	Neg.	%							
Human										
Opossum pos.	2	0		0.15		6.67	100.00	100.00	5.17	53.33
Opossum neg.	28	30	3.33							
Cattle										
Opossum pos.	1	0		0.31		3.33	100.00	100.00	50.85	51.66
Opossum neg.	29	30	1.67							
Dogs										
Opossum pos.	14	4		0.004	5.69 (1.38<OR<25.39)	46.67	86.67	77.78	61.90	66.67
Opossum neg.	16	26	30.00							
Opossum										
Opossum pos.	10	2		0.30	2.50 (0.34<OR<22.37)	41.67	77.78	83.33	33.33	51.52
Opossum neg.	14	7	36.36							
All species										
Opossum pos.	27	6		0.0004	4.81 (1.76<OR<13.83)	23.68	93.94	81.82	51.67	56.34
Opossum neg.	87	93	15.49							

Prev. – Prevalence only to sorovar Opossum; S_e – Sensitivity; S_p – Specificity; P_{pv} – Predictive positive value; P_{nv} – Predictive negative value; A - Accuracy

Table 3 - Microscopic Agglutination titers in sera of human, cattle and dog species and prevalence before and after inclusion of Opossum serovar.

Species	Titers MAT									Total	Prev-1	Prev-2
	NR	25	50	100	200	400	800	1600	3200			
Human	30	17	10	3	0	0	0	0	0	60	50.00%	50.00%
Opossums	09	05	13	06	0	0	0	0	0	33	72.72%	78.78%
Cattle	30	0	0	24	5	1	0	0	0	60	50.00%	50.00%
Dogs	30	0	0	15	8	2	2	1	2	60	50.00%	56.67%
Total	99	22	23	48	13	3	2	1	2	213	53.52%	56.34%

NR – not reagent; Prev - prevalence

Table 4 – Microscopic Agglutinins titers of MAT with standard pathogenic and saprophytic serovars and titers of isolated Opossum serovar.

Titer MAT	Titer Opossum							Tot.
	0	25	50	100	200	400	800	
0	93	1^m	1^m	4^d	0	0	0	99
25	20	1^m	0	1^h	0	0	0	22
50	17	5^m	1^h	0	0	0	0	23
100	36	3^m	1^m	7^{6d1c}	0	0	1^d	48
200	11	0	0	0	1^d	1^d	0	13
400	2	0	0	1^d	0	0	0	3
800	1	0	0	0	0	1^d	0	2
1600	0	0	0	1^d	0	0	0	1
3200	0	0	0	1^d	1^d	0	0	2
Tot	180	10	3	15	2	2	1	213

m=marsupial; h = human; d = dog; c = cattle

Table 5 - Frequency and sensitivity of MAT in 34 positives reactions dog sera using traditional *Leptospira* panel and Opossum isolate.

Serovar	Nº of reactions	Sensibility %	p value	Genome sp.
Opossum (isolate)* CCZ/465	18	52.94	< 0.001	<i>L. borgpetersenii</i>
canícola Hond Utrecht IV	17	50.00	< 0.001	<i>L. interrogans</i>
kito** CCZ/89	11	32.35	= 0.001	<i>L. interrogans</i>
tande** CCZ/463	10	29.41	= 0.002	<i>L. interrogans</i>
copenhageni M20	9	26.47	= 0.004	<i>L. interrogans</i>
icterohaemorrhagiae RGA	6	17.65	= 0.02	<i>L. interrogans</i>
mike** CCZ/90	5	14.71	= 0.04	<i>L. interrogans</i>
ballum Mus 127	4	11.76	= 0.07	<i>L. borgpetersenii</i>
illini	4	11.76	= 0.07	<i>L. illini</i>
icterohaemorr. Kantorovic	4	11.76	= 0.07	<i>L. interrogans</i>
castellonis Castellón	3	8.82	= 0.12	<i>L. borgpetersenii</i>
kade** CCZ/69	2	5.88	= 0.20	<i>L. interrogans</i>
copenhageni L1-130	1	2.94	= 0.37	<i>L. interrogans</i>
autumnalis Akiyami A	1	2.94	= 0.37	<i>L. interrogans</i>
caco** CCZ/81	1	2.94	= 0.37	<i>L. noguchii</i>
bratislava Jez Bratislava	1	2.94	= 0.37	<i>L. interrogans</i>
bonito** CCZ/380	1	2.94	= 0.37	<i>L. interrogans</i>
ike** CCZ/27	1	2.94	= 0.37	<i>L. interrogans</i>
Total	99			

** local isolates

Table 6 – MAT reactions carried on 60 dog sample sera using Opossum isolate and canicola serovars (Mix)

MAT									
Mix	Pos.	Neg.	p	S _e	S _p	P _{pv}	P _{nv}	A	k
pos.	24	4	< 0.0001	80.0	86.67	85.71	81.25	83.33	0.67
neg.	6	26							

S_e – Sensibility; S_p – Specificity; P_{pv} – Predictive positive value; P_{nv} – Predictive negative value; A – Accuracy; k - kappa

The value kappa ranges of agreement (Sackett, 1992)

0.0 – 0.2 = slight

0.2 – 0.4 = fair

0.4 – 0.6 = moderate

0.6 – 0.8 = substantial

0.8 – 1.0 = almost perfect agreement between tests

Figure 1 – *Leptospira* Genus identification and pathogenic characterization of Opossum isolate by *LipI32* and *16S rRNA* partial gene amplification by PCR. 1- DNA ladder (1Kb DNA ladder pluss); 2- Opossum isolate (*16S rRNA*); 3- Opossum isolate (*LipI32*); 4 -*Leptospira interrogans* Lai (*LipI32*)

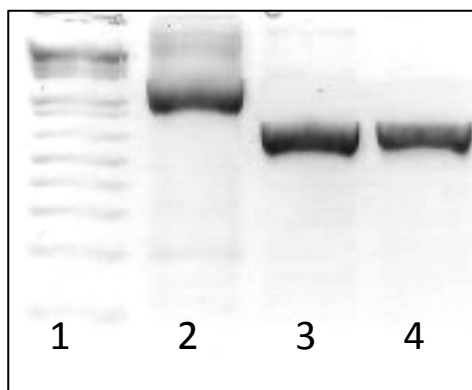
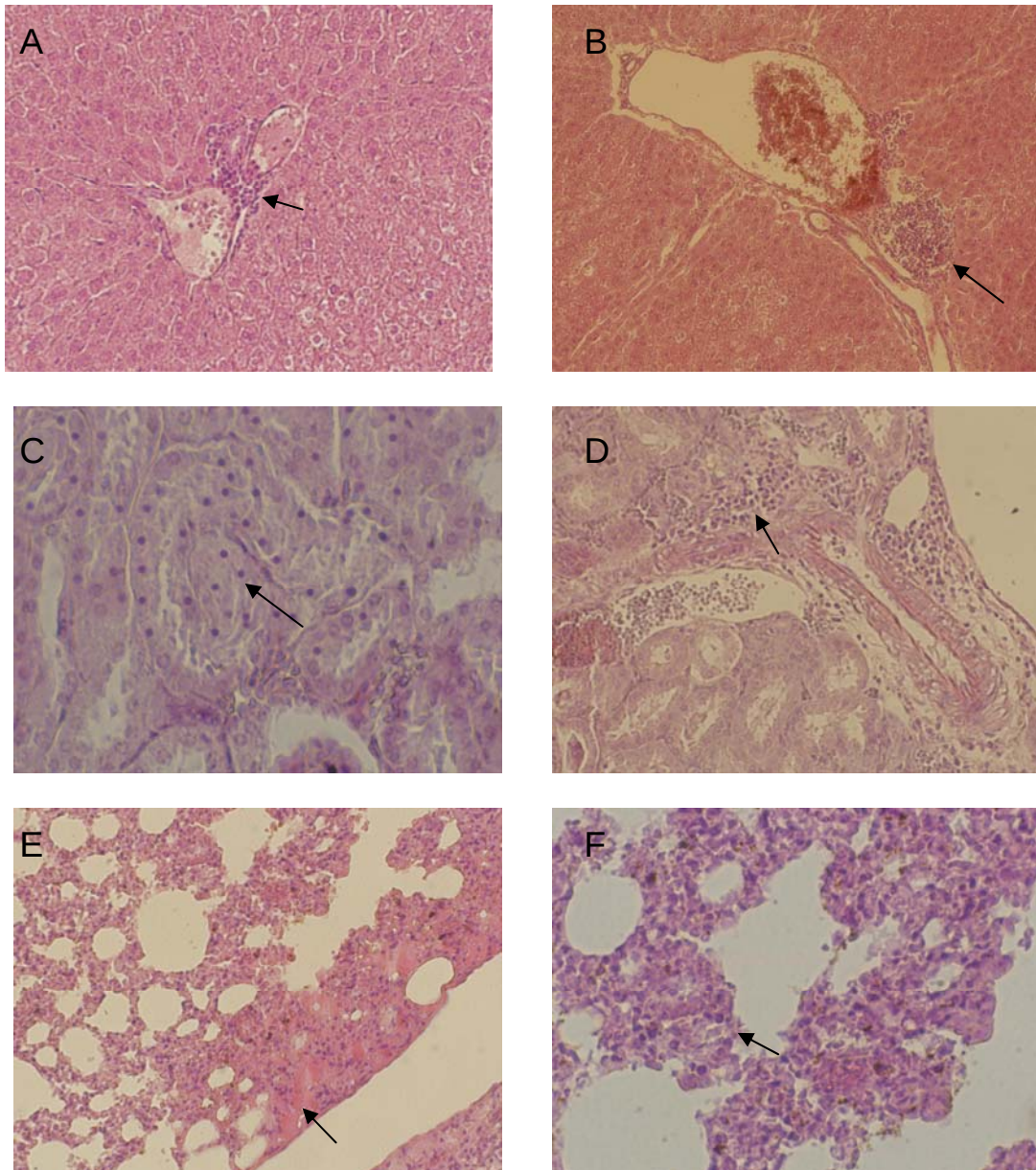


Figure 2- Histopathology analysis of hamster tissues stained with hematoxylin and eosin. (A) and (B) Liver, (C) and (D) Kidney, (E) and (F) Lung from hamster inoculated 10^8 *L. borgpetersenii* cells Opossum serovar. Note pathologic changes in all tissues. (A) Liver with the lobular vein center is infiltrated by lymphocytes cells. (B) Lymphocytic infiltrate in lobular vein center. (C) Picnosis nuclei in cells of renal tubules. (D) Renal infiltration of lymphocytes and plasma cells (E) Hemorrhage of the lung (long arrow). (F) Pulmonary infiltration.



5 CONCLUSÃO GERAL

O marsupial *Didelphis albiventris* é um reservatório de *Leptospiras* patogênicas na região estudada.

A espécie de *Leptospira* isolada (*L.borgpetersenii*) é patogênica e virulenta.

A cepa de *Leptospira* isolada de *Didelphis albiventris* aumentou a sensibilidade do teste de aglutinação microscópica (MAT) para o diagnóstico de Leptospirose em caninos e foi incluída na coleção de bactérias no CCZ-UFPEl para realização da MAT ..

Novos trabalhos de isolamento de *Leptospira* devem ser realizados em animais silvestres para obtenção e caracterização de um maior número de cepas, a fim de avaliar possíveis reservatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA P. N.; SZYFRES B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, Washington. 1986.

BABUDIERI B. Animal reservoirs of leptospires. **Ann N Y Acad Sci.** 3;70(3):393–413.1958.

BHARADWAJ R. Leptospirosis - a reemerging disease? **Indian Journal Medical Research**, p.136-138. 2004.

BHARTI A. R.; NALLY J. E.; RICARDI J. N.; MATTHIAS M. A.; DIAZ M. M.; LOVETT M. A.; LEVETT P. N.; GILMAN R. H.; WILLIG M. R.; GOTUZZO E.; VINETZ J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**, p. 757-771. 2003.

BOURSCHEIDT, D. ; SILVA, É. F. ; SEYFFERT, N. ; RECUERO, A.L.C. ; FORSTER, K.M. ; MICHELS, G.H. ; LANGONE, P.Q. ; ANTUNES, G.M. ; BROD, C.S. . Sorologia para a leptospirose em *Didelphis albiventris*. In: **XII Congresso de Iniciação Científica / V Encontro da pós-Graduação**, Pelotas. Do fogo ao holograma: de Darwin ao DNA, do homem para o homem, 2003.

BRENNER D. J.; KAUFMANN A. F.; SULZER K. R.; STEIGERWALT A. G.; ROGERS F. C.; WEYANT R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 839-858. 1999.

BRIHUEGA, B.; PAVÁN, , M. ; CAIRÓ, F; VENZANO, A. ; AUTERI, C.; FUNES, D. ; ROMERO, G. ; SAMARTINO, L. *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). **Revista Argentina de Microbiología**. 39: 19. 2007.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R. AND DELLAGOSTIN, O .A. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38 (4):294-300. 2005

BUSCH, L. A. Epizootiology and Epidemiology of Leptospirosis. **Journal of Wildlife Diseases**. Vol. 6,1970.

CARTER, G. R.; **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo. Ed. Roca, 1988. p.. 203-206

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M.; A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**. 2009.

CHAPMAN, A.J.; ADLER, FAINE, S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **J. Med. Microbiol.** 25: 269-278. 1988

CORDERO, R.G.A.; NICOLAS, R.A.B. Comparacion de la dieta del rabipelado (*Didelphis marsupialis*) en ambientes naturales Y urbanos en Venezuela. **Acta Cientifica Venezolana**, v.3. p.159-163. 1992.

DAY, T. D.; O'CONNOR, C. E.; WAAS, J. R.; PEARSON, A. J.; MATTHEWS, L R. **Transmission of *Leptospira interrogans* serovar balcanica infection among socially housed brushtail possums in New Zealand**. Journal of Wildlife Disease. Vol. 34, July, 1998.

DEAN, A. G; DEAN J. A. ;COULOMBIER, D. **Epi Info™**, Version 6.04a, a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 1996

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C. R. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **Braz. J. Infect. Dis.** 11, 142–148. 2007.

DURFEE, P. T.; PRESIDENTE, P. J. A. A sero-epidemiological study of *Leptospira interrogans* serovar *balcanica* in four brush-tailed possum populations in Victoria, Australia. **The Australian Journal of experimental biology Med Sci**, p.191–201..1979.

EDELWEISS, E. L. **Leptospirose humana** (contribuição ao seu estudo). Tese (doutorado em Medicina) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina de Porto Alegre, Porto Alegre, RS. 1962

FAINE, S.; ***Leptospira* and Leptospirosis**. CRC Press, Boca Raton, Fla. USA, 1994.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptosirosis**. World Health Organization Offset Publication. Geneva, 1982.

FAINE S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P.; ***Leptospira* and Leptospirosis**. 2.Ed, Melbourne, Australia, Ed. MediSci. 1999.

FERESU, S. B.; ANN, B. C. ; VAN, K. H.; KORVER, H. Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. **Zentralblatt fur Bakteriologie**. 289:19-29.1999.

FÜHNER, F. Über die Bedeutung der Mitreaktionen artverschiedener Leptospirenantigene bei der Auswertung serologischer Leptospiroseergebnisse für Klinik und Praxis. **Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie**. 108, 278. 1950.

GAIO, F. C; FACCIONI, P. Y.; FORNAZARI, F.; LAUGONI, H. Anticorpos anti-leptospíricos e anti-*Toxoplasma gondii*, em gambás (*Didelphis albiventris*). In: **XXXI Congresso Annual da Sociedade de Zoológicos do Brasil, XIV Congresso Annual da “Asociación Latinoamericana de parques zoológicos e acuarios”; XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**. São Paulo, 2007

GLOSSER, J. W; SULZER, C. R; EBERHARDT, M; WINKLER, W. G; CULTURAL AND SEROLOGIC EVIDENCE OF *Leptospira interrogans* SEROTYPE Tarassovi INFECTION IN TURTLE. **Journal of Wildlife Diseases** Vol. 10, October, 1974

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.** v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W.J. Leptospirosis in wild animals. **The Veterinary Quarterly**, v.18, p.149-50, Supplement. 3. 1996

HATHAWAY, S. C.; BLACKMORE, D. K.; MARSHALL, R. B. Leptospirosis in free-living species in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**. Vol. 17, No. 4, October, 1981.

HIDALGO, J. L.; SULZER, K. Six New Leptospiral Serovars Isolated from Wild Animals in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 944-945. 1984

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 2003.

INTERNACIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY. 2005. <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.htm>

ISTURIZ, R. E., TORRES, J.; BESSO, J. Global distribution of infectious diseases requiring intensive care. **Crit. Care Clin.** 22, 469–488; ix. 2006.

KINDLOVITS, A. **Clínica e terapêutica em primatas neotropicais**. Luiz de For-
MG, Ed. UFJF. 1999

KO, A. I.; GALVAO, R. M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D. JR.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Salvador Leptospirosis Study Group**. *Lancet*, 354, 820-825, 1999.

LA SCOLA, BERNARD; BUI, LAN T.M.; BARANTON, GUY; KHAMIS, ATIEH; RAOULT, DIDIER. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiol Lett.** 263.142–147. 2006.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (didelphidae: *didelphis*). **Journal of Mammalogy**, 83(2) p. 354–369, mai. 2002.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 296–326. V 14. 2001

LEVETT, P. N. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? **Journal of Medical Microbiology**, 48, p. 417-418. 1999.

LUNA-ALVAREZ, M. A.; MOLES-CERVANTES, L. P.; TORRES-BARRANCA, J. I. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio em El zoológico de Chapultepec de La Ciudad de México. **Veter. Mexico**, v.27, n.3, p. 229-234, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Controle de Roedores**, Brasília. D.F.2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Leptospirose**. Brasília, D. F. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5 ed. Brasília, D.F.. 2002.

PACHALY, J.R. ; BRITO H.F.V. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. **Hora Veterinária**, v.118, n.2, p.59-65, 2000.

PEREIRA, M. M.; SILVA, J. J. P.; PINTO, M. A. ; SILVA, M. F.; MACHADO, M. P.; LENZI, H. L.; MARCHEVSKY, R. S.; Experimental Leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 72(1),p. 13–20. 2005.

RAMADASS P.; JARVIS B. D.; CORNER R. J.; PENNY D.; MARSHALL R. B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 42, 215-219. 1992.

REILLY, J. R. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. **Journal of Wildlife Diseases** Vol. 6, October, 1970.

REN S. X.; FU G.; JIANG X. G.; ZENG R.; MIAO Y. G.; XU H.; ZHANG Y. X.; XIONG H.; LU G.; LU L. F.; JIANG H. Q.; JIA J.; TU Y. F.; JIANG J. X.; GU W. Y.; ZHANG Y. Q.; CAI Z.; SHENG H. H.; YIN H. F.; ZHANG Y.; ZHU G. F.; WAN M.; HUANG H. L.; QIAN Z.; WANG S. Y.; MA W.; YAO Z. J.; SHEN Y.; QIANG B. Q.; XIA Q. C.; GUO X. K.; DANCHIN A.; SAINT G., I.; SOMERVILLE R. L.; WEN Y. M.; SHI M. H.; CHEN Z.; XU J. G.; ZHAO G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by wholegenome sequencing. **Nature**, 422, p. 888-893. 2003.

RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* Gene Analysis as a Novel Strategy for Identification of Spirochetes from the Genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2200–2203. 2000.

SANTA ROSA, C.A.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; SILVA, A.S.; YANAGUITA, R.M.; LOBAO, A.O. Leptospirosis in wildlife in Brazil; isolation of a new serotype in the pyrogenes group. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n. 9, p.1363-1365, 1975.

SANTA ROSA C. A.; CASTRO A. F. P. D.; SILVA A. S. D.; TERUYA J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 19-27.1970.

SILVA J. F. P. Leptospirose. **Revista Acadêmica de Medicina**, 3, 39-44. 1998.

SOSA, G.; SANTOS, O.; DUARTE, C.L.; HERNANDEZ, D.; DELGADO, L. Investigación sorológica y bacteriológica de leptospirosis realizada en fauna exótica. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v.19, n.3, p.219-26, 1988.

SPINU I. T. V. T. H. L'homme comme reservoir de virus dans une epidemie de leptospirose survenue dans la jungle. **Archives Roumaines de Pathologie Experimentales et de Microbiologie**, 22, p. 1081-1100. 1963

SZALKA A.; BINDER L. A rare case of human-to-human infection of leptospirosis. **Orvosi Hetilap**, 115, p. 1531-1532. 1974.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K. ; CARTER, M. E. DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C.; **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, ARTMED.2005.

TORTEN, M. Leptospirosis. In: STOENNER, H. E ; TORTEN M. AND KAPLAN, W. CRC handbook series in zoonoses, section A: **bacterial, rickettsial and mycotic diseases**, CRC Press, Boca Raton, Flórida, vol. I, p. 363-420, 1979.

VERONESI R.; LOMAR A. V.; DE BRITO T. ; DIAMENT D. Leptospiroses In: **Tratado de Infectologia**. Atheneu, São Paulo,p. 987-1003. 1996.

VIVIAN, J.P.; BEDDOE, T.; MCALISTER A. D.; WILCE, M.C.J.; ZAKER-TABRIZI, L.; TROY, S.; BYRES, E. ; HOKE, D. E.; CULLEN, P. A.; LO, M.; MURRAY, G.; ADLER, B.; ROSSJOHN, J. Crystal Structure of LipL32, the Most Abundant Surface Protein of Pathogenic *Leptospira* spp. **J. Mol. Biol.** 2009.

WALLACH, J. D; BOEVER, W. L; **Disease of Exotic Animals Medical and Surgical Management**. Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1983.

XIAO J., DAI B., CHAI J.; YU L. The study on genome size of leptospires. **Journal of West China University of Medical Sciences**, 21, 362-365. 1990.

YASUDA, H. P. Deoxyribonucleic acid relatdness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira interrogans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.407-415, 1987.

ZUERNER, R. L. Physical map of chromossomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. **Nucleic Acids Research**, 19, 4857-4860, 1991.

ZUERNER, R. L .; ALT, D. P.; Variable Nucleotide Tandem Repeat Analysis 1 Reveals a Unique Group of 2 *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Isolates Associated with 3 California Sea Lions. **J. Clin. Microbiol.** 2009.

ANEXO 1
AUTORIZAÇÃO IBAMA SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13755-1	Data da Emissão: 20/12/2007 18:40	Data de Validade: 19/12/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2252837	Nome: Sérgio ...	CPF: 140.431.628-04
Título do Projeto: Dissertação de mestrado: Epidemiologia ecológica em focos de espírios em mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		CNPJ: 92.242.080/0001-00

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Marco Antonio Afonso Coimbra	Biólogo	961.017.760-34	7070902701 SSP-RS	Brasileira
2	Ana Paula Neuschrank Albano	Médica Veterinária	691.305.660-53	1052930839 SJS-RS	Brasileira
3	ADRIANA GOMES LARRONDO	Processamento das fezes e biometria	529.545.790-72	2032264737 ssp-pc-RS	Brasileira
4	Claudiomar Soares Brod	Orientador	218.979.560-53	2015675313 SSP-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAPA DO LEAO	RS	Campus UFPel e arredores	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Didelphimorphia
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphimorphia
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Didelphimorphia (*Qtde: 60)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Didelphimorphia

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fezes, Sangue, Urina
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco

Destino do material biológico coletado

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão pode verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87678933

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13755-1	Data da Emissão: 20/12/2007 18:40	Data de Validade: 19/12/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2252837	Nome: Sérgio ...	CPF: 140.431.628-04
Título do Projeto: Dissertação de mestrado: Epidemiologia ecológica e molecular de apespiros em mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		CNPJ: 92.242.080/0001-00

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	Universidade Federal de Pelotas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87678933



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13755-1	Data da Emissão: 20/12/2007 18:40	Data de Validade: 19/12/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2252837	Nome: Sérgio	CPF: 140.431.628-04
Título do Projeto: Dissertação de mestrado: Epidemiologia ecológica e imunidade de espírios em mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		CNPJ: 92.242.080/0001-00

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007. , a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87678933

Página 3/3