

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Caracterização fenotípica e sequenciamento do
genoma de *Leptospira kirschneri* isolada de caso
clínico humano**

Carlos Eduardo Pouey da Cunha

Pelotas, 2014

Carlos Eduardo Pouey da Cunha

Caracterização fenotípica e sequenciamento do genoma de *Leptospira kirschneri* isolada de caso clínico humano

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

Orientador: Odir Antonio Dellagostin

Coorientadores: Alan John Alexander McBride

Claudia Pinho Hartleben

Pelotas, 2014

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

C972c Cunha, Carlos Eduardo Pouey da
Caracterização fenotípica e sequenciamento do genoma de *Leptospira kirschneri* isolada de caso clínico humano / Carlos Eduardo Pouey da Cunha. – 55f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Odir Antonio Dellagostin ; coorientadores Alan John Alexander McBride e Claudia Pinho Hartleben.

1.Biotecnologia. 2.Isolamento. 3.Leptospira.
4.Leptospirose. 5.Virulência. 6.Caracterização.I.Dellagostin, Odir Antonio. II.McBride, Alan John Alexander. III.Hartleben, Claudia Pinho. IV.Título.

CDD: 614.56

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr. Leonardo Garcia Monte (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr. Alan John Alexander McBride (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr. Samuel Rodrigues Félix (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

Agradecimentos

Aos pais Maria Tereza e Carlos, irmãs Paula e Mariana e demais familiares, pelo apoio incondicional e por proporcionar que este momento se tornasse realidade.

Aos professores Odir Dellagostin, Cláudia Hartleben e Alan McBride pelas oportunidades, orientações, ensinamentos e amizade.

Aos demais professores, colaboradores e colegas que contribuíram para minha formação profissional e pessoal durante a realização deste curso.

Ao Leonardo Monte, Alan McBride e Samuel Félix, membros da banca examinadora, por contribuírem para a construção e aprimoramento deste trabalho. Ao Sérgio Jorge por revisão do presente documento.

Aos colaboradores dos Laboratórios de Vacinologia, Imunologia Aplicada, Pesquisa em Doenças Infecciosas e Imunodiagnóstico da Universidade Federal de Pelotas pela parceria em projetos possibilitando o desenvolvimento dos trabalhos aqui apresentados. Aos mesmos também pelos momentos de diversão, amizade que possibilitaram meu desenvolvimento, tanto profissional quanto pessoal, bem como por tornar o laboratório um local agradável de se trabalhar.

Aos demais amigos e colegas pela amizade e pelos momentos de descontração e apoio que ajudaram a tornar essa jornada menos árdua.

À Capes, ao CNPq e à FAPERGS por concessão de bolsa de mestrado e financiamento do trabalho desenvolvido.

Resumo

CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da. **Caracterização fenotípica e sequenciamento do genoma de *Leptospira kirschneri* isolada de caso clínico humano**. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose negligenciada difundida mundialmente com mais de 800.000 casos em humanos por ano. A doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, classificadas em 10 espécies e mais de 260 sorovares, agrupados em mais de 30 sorogrupos. As principais espécies responsáveis por casos de leptospirose humana são *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri*. No Brasil, onde os climas tropical e subtropical favorecem a disseminação da doença, a maioria dos casos é causada por *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Apesar de Pelotas apresentar um clima temperado, a taxa de infecções por *Leptospira* (10 casos por 100 mil habitantes) é superior a regiões com climas tropical e subtropical (3.5 casos por 100 mil habitantes). Trabalhos de vigilância em leptospirose desempenham papel fundamental no combate à doença identificado espécies e sorovares endêmicos a determinada região. Este trabalho descreve o isolamento e caracterização de uma cepa de *Leptospira* de uma paciente da zona rural de Pelotas que relatou contato com coleções hídricas, bovinos, caninos e roedores, e apresentou sintomas clássicos da fase aguda da doença. O isolado foi caracterizado como *L. kirschneri* sorogrupo Pomona sorovar Mozdok, conforme determinado por *multilocus sequence typing* (MLST). O genoma do isolado possui 3.398 sequências codificadoras, 39 tRNAs, 1 região codificadora de rRNA e conteúdo G+C de 34,6%. O cromossomo I tem 3.738.643 pares de base, e o segundo, 335.634, totalizando 4,07 Mb. Imunofluorescência indireta mostrou a expressão dos fatores de virulência LipL32, LigA e LigB. O isolado foi capaz de causar danos severos aos tecidos renal, hepático e pulmonar, como revelado por histopatologia e a presença de leptospiros nesses tecidos confirmada pela técnica de *imprint*. Este é o primeiro relato de isolamento de *L. kirschneri* sorovar Mozdok de caso clínico humano no Hemisfério Sul, de acordo com a literatura disponível. Os resultados aqui apresentados são de grande importância epidemiológica, bem como para o desenvolvimento de novas vacinas e testes rápidos de diagnóstico.

Palavras-chave: Isolamento, *Leptospira*, leptospirose, virulência, caracterização.

Abstract

CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da. **Phenotypic characterization and genome sequencing of *Leptospira interrogans* isolated from a human case of leptospirosis**. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a neglected zoonosis spread worldwide with more than 800,000 human cases each year. The disease is caused by pathogenic members of the genus *Leptospira*, which is classified in 10 species and more than 260 serovars, grouped in more than 30 serogroups. The main species associated with human cases of leptospirosis are *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*. *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae causes the majority of human leptospirosis cases in Brazil, where the tropical and subtropical climates favour the spread of the disease. Even though the climate in Pelotas is temperate, *Leptospira* infection rates (10 cases per 100 thousand inhabitants) are higher than other regions with tropical and subtropical climates (3.5 cases per 100 thousand inhabitants). Leptospirosis surveillance studies play a vital role against the disease through the identification of endemic species and serovars to a given region. This work describes the characterization of a *Leptospira* strain isolated from an inhabitant of the rural area of Pelotas. The patient reported contact with water, cattle, dogs and rodents and presented classical symptomatology for leptospirosis. Multilocus sequence typing (MLST) determined the isolate to be a *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok. The genome of the isolate includes of 3,398 coding sequences, 39 tRNAs, 1 rRNA coding region and 34.6% G+C content. Chromosome I has 3,738,643 base pairs, and chromosome II has 335,634 base pairs, totalizing 4.07 Mb. Indirect immunofluorescence showed the expression of LigA and LigB virulence factors as well as the LipL32 protein. The isolate was capable of causing severe renal, hepatic and lung damage, as revealed by histopathological analysis and the presence of leptospires in these tissues was confirmed by the imprint technique. This is the first report of isolation of *L. kirschneri* serovar Mozdok from a human patient in the Southern Hemisphere, according to the literature. Results presented herein are important for epidemiologic studies, as well as for the development of new vaccines and rapid diagnosis tests.

Keywords: Isolation, *Leptospira*, leptospirosis, virulence, characterization.

Lista de Figuras

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando amplificação do gene <i>lipL32</i> do isolado obtido.....	35
Figura 2. Mapas dos cromossomos I (painel A) e II (painel B) do isolado 61H.	36
Figura 3. Dendrograma construído com base em sequências concatenadas dos sete <i>loci</i> usados no esquema de MLST.	38
Figura 4. Imunofluorescência indireta para detecção de antígenos associados à membrana externa do isolado 61H.	39
Figura 5. Análises histopatológicas mostrando seções de rim, fígado e pulmão de animais infectados com o isolado 61H.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação dos dados do genoma do isolado 61H com os genomas de <i>Leptospira kirschneri</i> sorovar Mozdok depositados no GenBank.....	36
---	----

Lista de Abreviaturas

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

BLAST – *Basic local alignment search tool* (Ferramenta de busca por alinhamento local básico)

BSA – *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CAAT – *Cross agglutinin adsorption test* (teste de aglutinação com adsorção cruzada)

CDS – *coding sequence* (sequencia codificadora)

DL₅₀ – Dose letal 50%

DNA – *Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

EMJH - Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

Lacen – Laboratório central do estado

LPS - Lipopolissacarídeo

MAT – *Microscopic agglutination test* (soroaglutinação microscópica)

MLST – *Multilocus sequence typing* (tipificação de sequências de vários *loci*)

MLVA – *Multiple loci variable number of tandem repeats analysis* (análise da variação do número de repetições em tandem em vários *loci*)

OMP – *Outer membrane protein* (proteína de membrana externa)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

qPCR – *quantitative polymerase chain reaction* (reação quantitativa em cadeia da polimerase)

PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis* (eletroforese em gel com campo pulsado)

RAPD – *Random amplified polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente)

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragment de restrição)

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
em tempo real)

ST – *Sequence type* (tipo de sequência)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Leptospirose.....	15
2.1.1 Aspectos históricos	15
2.1.2 Infecção e sintomatologia	15
2.1.3 Diagnóstico	16
2.1.4 Prevenção.....	18
2.1.5 Tratamento	20
2.2 O agente: <i>Leptospira</i> spp.....	20
2.2.1 Taxonomia	21
2.2.2 Microbiologia.....	21
2.2.3 Aspectos epidemiológicos	22
2.3 Técnicas para a caracterização de isolados de <i>Leptospira</i>	23
2.3.1 Caracterização da virulência.....	23
2.3.2 Caracterização sorológica	24
2.3.3 Técnicas moleculares	25
2.4 Os genomas de <i>Leptospira</i> spp.	26
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	29
3.1 Hipótese.....	29
3.2 Objetivo Geral	29
3.3 Objetivos Específicos.....	29
4 CAPÍTULOS	30
4.1 Relatório de Atividades	30
4.1.1 Material e Métodos	30
4.1.1.1 Critérios de inclusão e definição de fase aguda	30

4.1.1.2	Obtenção de amostra clínica para isolamento.....	30
4.1.1.3	Cultivo de <i>Leptospira</i> spp.	30
4.1.1.4	Isolamento de <i>Leptospira</i>	31
4.1.1.5	Soroaglutinação microscópica.....	31
4.1.1.6	Sequenciamento e análise genômica	31
4.1.1.7	Caracterização molecular	32
4.1.1.8	Imunofluorescência indireta.....	33
4.1.1.9	Caracterização da virulência em modelo animal	33
4.1.2	Resultados.....	34
4.1.2.1	Obtenção de um isolado de <i>Leptospira</i> sp.	34
4.1.2.2	Soroaglutinação microscópica.....	35
4.1.2.3	Análise genômica	35
4.1.2.4	Caracterização molecular	37
4.1.2.5	Caracterização da virulência.....	38
4.1.3	Discussão	41
4.1.4	Conclusão.....	43
5	CONCLUSÃO GERAL.....	44
7	REFERÊNCIAS.....	45
8	ANEXOS	55
	Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	55
	Anexo B – <i>Dispatch</i> que será submetida à revista <i>Emerging Infectious Diseases</i>	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, difundida mundialmente, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, classificado em 6 espécies saprofíticas, 5 intermediárias e 10 patogênicas, divididas em mais de 260 sorovares patogênicos (Bourhy et al., 2014). *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* são as espécies mais comumente associadas à doença em humanos (Boonsilp et al., 2013), sendo estimados mais de 873.000 casos por ano (Picardeau et al., 2014).

A infecção pode ocorrer indiretamente pelo contato com solo ou água contaminados ou diretamente por contato com urina contaminada. Apesar de colonizarem os rins, *Leptospira* spp. patogênicas podem danificar outros órgãos, como fígado e pulmões (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). A leptospirose pode ocorrer desde uma forma assintomática, passando por um quadro clínico similar a um quadro gripal até sua forma mais grave, apresentando hemorragia pulmonar difusa e falência dos rins e fígado (Ko et al., 2009). Na primeira fase, onde há bacteremia, a doença apresenta febre e dores musculares e de cabeça entre outros sintomas. Posteriormente, caso não tratada, a leptospirose pode desenvolver-se em suas formas mais severas, conhecida como Síndrome de Weil, que pode ser fatal e apresenta, além dos sintomas supracitados, falência renal, hepática e hemorragia pulmonar e taxa de letalidade próxima aos 10% (Faine et al., 1999). A síndrome hemorrágica pulmonar aguda, outra forma de leptospirose severa, apresentar taxa de letalidade superior a 50% (McBride et al., 2005)

Apesar de a leptospirose estar presente em todo o país, no estado do Rio Grande do Sul, devido a seu clima subtropical, a doença apresenta uma média de 512,5 casos de leptospirose por ano entre 2000 e 2013, com 7,2% de letalidade média (dados disponíveis em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados> - acesso em 18/08/2014). A vacinação é o método mais indicado para a prevenção de populações em áreas de risco, bem como obras de infraestrutura (McBride et al., 2005). Entretanto, as vacinas humanas atuais (bacterinas) estão restritas a poucos países (Cuba, França, Japão e China), são reatogênicas e conferem proteção específica contra os sorovares nelas contidos (Dellagostin et al., 2011). A realização de um levantamento dos sorovares prevalentes em áreas endêmicas, bem como o isolamento desses microrganismos, é

de extrema importância e desempenha um papel chave para que se torne possível o desenvolvimento de uma vacina recombinante de subunidade que seja eficiente contra os sorovares endêmicos a determinada região. Além disso, tal estudo também pode dar grande contribuição ao aprimoramento de testes rápidos para o diagnóstico de leptospirose.

Para tal finalidade, amostras de sangue de pacientes humanos foram obtidas de uma clínica médica na cidade de Pelotas e usadas para isolamento de *Leptospira* spp., bem como para análises sorológicas. Os pacientes que concordaram em participar assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo A). Os estudos de isolamento e caracterização foram desenvolvidos no Laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas com auxílio do Laboratório de Imunodiagnóstico da mesma unidade. O DNA genômico extraído do isolado foi sequenciado por uma empresa especializada. Os resultados obtidos foram relatados em um manuscrito que será submetido à revista *Emerging Infectious Diseases* na forma de *Dispatch* (Anexo B).

Os resultados obtidos no presente trabalho serão de grande importância em futuros estudos sobre a prevalência de leptospirose tanto na população humana quanto animal, bem como no desenvolvimento de novas vacinas e testes rápidos de diagnóstico. Os dados obtidos no sequenciamento do genoma do isolado podem auxiliar no entendimento da fisiologia, patogenicidade e evolução dentre outros aspectos relativos as leptospirosas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leptospirose

2.1.1 Aspectos históricos

A leptospirose foi primeiramente descrita no século 19 durante cerco ao Cairo (1812), embora ainda sem causas conhecidas, por Larrey. Posteriormente, em 1883, os sintomas da leptospirose, embora ainda não tivesse esse nome, foram associados a trabalhadores do sistema de esgotos de Paris por Landouzy. Em 1887, Goldschmidt denominou a doença de Síndrome de Weil, em homenagem a Adolf Weil, que havia previamente descrito os sintomas. Somente em 1914 os pesquisadores Inada e Ido conseguiram provar que uma espiroqueta era o agente etiológico da doença (Inada et al., 1916). Finalmente, em 1918, Noguchi criou o gênero *Leptospira*, que dá origem ao nome leptospirose (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

2.1.2 Infecção e sintomatologia

A leptospirose é uma zoonose mundialmente difundida e negligenciada, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A infecção pode ocorrer após contato com urina de animais infectados, ou com solo ou água contaminados, e é associada a atividades recreativas nos países desenvolvidos e a atividades profissionais e à falta de saneamento em países subdesenvolvidos (Barcellos et al., 2003; McBride et al., 2005; Hochedez et al., 2013). A leptospirose apresenta um amplo espectro de sintomas, ou até a ausência dos mesmos, desde febre alta e sintomatologia similar à gripe até suas formas mais graves, conhecidas como Síndrome de Weil, caracterizada pela tríade icterícia, insuficiência renal e hemorragia, e a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Aguda, quando há hemorragia massiva nos pulmões. Tanto animais selvagens como domésticos podem atuar como portadores e disseminadores do patógeno, principalmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental (Ko et al., 2009).

A leptospirose pode apresentar-se tanto de forma anictérica como de forma icterícia (Faine et al., 1999). Na forma anictérica, a manifestação clínica divide-se em

duas fases. Inicialmente, há dores de cabeça, musculares, calafrios, febre alta e bacteremia. Na fase inicial, pode ocorrer a evolução da doença para suas formas mais graves, afetando rins, fígado e pulmões, causando falência desses órgãos e hemorragia. Essa fase costuma durar aproximadamente uma semana e é seguida pela segunda fase, denominada fase imune, caracterizada pela diminuição da febre e dos sintomas e, naturalmente, produção de anticorpos (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Ricaldi & Vinetz, 2006). A forma ictérica da doença é mais severa, apresentando taxa de mortes de até 15%, havendo disfunção hepática reversível e alteração no nível de transaminases (Levett, 2001).

A sintomatologia pode variar de acordo com a virulência e dose da cepa infectante, bem como com o estado de saúde do paciente. Muitos desses sintomas fazem com que a leptospirose seja confundida com outras doenças infecciosas, dificultando estudos epidemiológicos e tratamento, caracterizando a doença como negligenciada (Ko et al., 1999; McBride et al., 2005; Ricaldi & Vinetz, 2006).

2.1.3 Diagnóstico

A técnica considerada padrão para diagnóstico é a soroaglutinação microscópica (*microscopic agglutination test* - MAT). Nesse teste, o indicado é a realização do exame com amostras de soros pareadas, para que se possa observar a soroconversão (Levett, 2001; WHO, 2003; Ko et al., 2009). A manutenção de uma bateria de cepas vivas, necessárias para execução de MAT, acarreta em altos custos para o laboratório. Além disso, MAT pode proporcionar resultados falso negativos se o sorovar infectante estiver ausente na bateria. A subjetividade na interpretação dos resultados também pode levar a resultados falso negativos ou positivos (Chappel et al., 2004). Na rede de saúde pública brasileira, o MAT e ELISA para detecção de IgM são realizados pelo Laboratório Central do Estado (Lacen) (Brasil, 2010).

Outra técnica para diagnóstico de leptospirose é o isolamento do agente etiológico. Detecção do mesmo por pesquisa direta em microscopia de campo escuro é contra indicado (Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 1995). Estas duas metodologias possuem baixos níveis de sensibilidade, demandando tanto um longo período, como pessoal altamente treinado. A probabilidade de resultado falso negativo é alta uma vez que o isolamento nem sempre é possível

apesar da presença da *Leptospira* na amostra. Além disso, há grande chance de a bactéria não ser vista ou confundida com outra estrutura do soro ou urina por microscopia (Faine et al., 1999). Além disso, o resultado do isolamento pode estar disponível somente após algumas semanas, o que o torna dispensável. Exames rotineiros e bioquímicos como níveis de ureia, bilirrubina, creatinina, enzimas hepáticas, nitrito, nitrato, sódio e potássio também podem ser empregados no auxílio ao diagnóstico da doença (Ko et al., 1999; Gouveia et al., 2008; Kalugalage et al., 2013).

Atualmente, há diversas pesquisas no sentido de desenvolver novos testes diagnósticos que sanem as falhas das metodologias supracitadas. Nesse contexto, têm-se desenvolvido reações em cadeia da polimerase para detectar e quantificar a carga de leptospiros no sangue (qPCR), soro ou tecidos, ELISA, teste de aglutinação de microesferas de látex e testes imunocromatográficos (Terpstra et al., 1985; Palaniappan, 2004; Levett et al., 2005; Ahmed et al., 2006; McBride et al., 2007; Stoddard et al., 2009; Bourhy et al., 2011; Villumsen et al., 2012; Canal et al., 2013; González et al., 2013; Chirathaworn et al., 2014; Deneke et al., 2014; Ye et al., 2014). Para eliminar as adversidades do cultivo de baterias de sorovares de leptospiros, a maioria desses testes emprega antígenos recombinantes de *Leptospira* patogênicas, principalmente a proteína LipL32, presente em todas as espécies patogênicas de *Leptospira*, e os fatores de virulência LigA e LigB, com exceção da RT-PCR, que usa os respectivos genes como alvo. Entretanto, alguns trabalhos ainda empregam extratos de *Leptospira* (McBride et al., 2007). Além de serem mais eficientes, mais rápidos e em alguns casos mais baratos, novos testes apresentam também alta sensibilidade (até 10 células em amostra biológica) (Merien et al., 1992; Levett et al., 2005).

Os testes moleculares (qPCR) mais atuais têm focado na detecção do gene *lipL32* em urina, plasma e sangue (Levett et al., 2005; Stoddard et al., 2009; Villumsen et al., 2012; González et al., 2013). Recomenda-se a descontinuação de ensaios de diagnóstico molecular empregando o gene *rrs* (16S) devido a sua baixa especificidade em comparação com *lipL32* (Villumsen et al., 2012). Os trabalhos sobre qPCR descrevem ensaios utilizando tanto detecção por SYBR green como por sonda (TaqMan). Argumenta-se que estratégia empregando SYBR green oferece baixos custos em relação as estratégias que usam o sistema de detecção por sonda, uma vez que não utiliza sondas e a especificidade dos amplicons pode ser avaliada

através de uma curva de desnaturação (Levett et al., 2005). Por outro lado, a especificidade conferida pela estratégia de detecção por sonda é mais confiável, uma vez que é necessário também o anelamento da sonda e a fluorescência só é emitida após alguns ciclos de amplificação. A amplificação por polimerase e recombinase apresenta funcionamento similar à PCR, entretanto é capaz de detectar até 2 cópias do genoma de *Leptospira* spp. patogênicas por reação e não necessita de termociclador, sendo uma técnica isotérmica (Ahmed et al., 2014).

Testes de ELISA foram desenvolvidos tanto para a detecção de anticorpos contra antígenos de *Leptospira* spp. como para a captura dessas bactérias (Terpstra et al., 1985; Palaniappan, 2004; McBride et al., 2007; Canal et al., 2013; Deneke et al., 2014; Ye et al., 2014). Considerando-se a necessidade de diagnóstico para o correto tratamento da doença ainda na fase inicial, vários trabalhos desenvolveram ensaios para detecção de IgM, embora existam também outros testes que detectem anticorpos específicos para *Leptospira* de outros isotipos. Uma grande vantagem descrita por Palaniappan e colaboradores (2004) é a capacidade dos testes por eles descritos de diferenciar entre animais vacinados e aqueles naturalmente infectados.

Testes rápidos imunocromatográficos e baseados em aglutinação em látex também têm sido desenvolvidos (Deneke et al., 2014; Chirathaworn et al., 2014). A vantagem destes testes em relação aos demais citados reside no menor tempo necessário até o resultado final e a possibilidade de realizá-los a campo. Entretanto, o teste imunocromatográfico apresenta sensibilidade inferior aos testes descritos previamente (10^3 células por mL) (Chirathaworn et al., 2014). Por outro lado, o teste de aglutinação em látex apresentou sensibilidade e especificidade similares ao MAT (Deneke et al., 2014), enquanto ensaios de RT-PCR e amplificação por recombinase e polimerase têm capacidade de detectar até 2 cópias de genoma por reação (Ahmed et al., 2014).

A sensibilidade e a especificidade apresentados por muitos destes trabalhos demonstram o potencial dessas novas tecnologias, embora ainda deva haver mais estudos para melhorá-las e torná-las acessíveis à rotina de laboratórios de diagnóstico.

2.1.4 Prevenção

No contexto brasileiro, a transmissão da leptospirose se dá principalmente em cenários propícios à disseminação de roedores. Obras de saneamento básico que eliminem esgoto a céu aberto e diminuam consideravelmente a presença de roedores podem contribuir significativamente no combate à leptospirose. Além disso, medidas de infraestrutura para tratamento de água e higiene de alimentos e limpeza de áreas domiciliares recentemente inundadas também devem ser efetivas (Brasil, 2010; McBride et al., 2005).

As vacinas disponíveis atualmente são leptospiras mortas (bacterinas) ou baseadas na membrana externa e possuem algumas limitações. Dentre elas, destacam-se imunidade específica aos sorovares presentes na formulação, imunidade não duradoura e reatogenicidade (Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005; Dellagostin et al., 2011). Somente Japão, Cuba, França e China têm vacinas para humanos. A vacinação de animais domésticos (caninos, bovinos, ovinos etc) pode ter extrema importância no combate à leptospirose humana, embora animais imunizados ainda possam disseminar o patógeno através da urina (Dellagostin et al., 2011). Considerando-se as desvantagens apresentadas pelas bacterinas comerciais atualmente disponíveis, vêm-se desenvolvendo novas alternativas vacinais, como vacinas recombinantes de DNA, subunidade (fusionadas ou coadministradas a peptídeos com propriedades adjuvantes), adenovírus, e vetores de BCG (Haake et al., 1999; Seixas, Fernandes, et al., 2007; Seixas, da Silva, et al., 2007; Yan et al., 2009; Coutinho et al., 2011; Dellagostin et al., 2011; Félix et al., 2011; Hartwig et al., 2011; Grassmann et al., 2012; Forster, Hartwig, Seixas, Bacelo, et al., 2013; Hartwig et al., 2013; Murray et al., 2013; Lourdault et al., 2014; Humphries et al., 2014). Nesse sentido, os principais alvos têm sido proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs) e fatores de virulência que sejam reconhecidos por soro de pacientes naturalmente infectados (LigA, LigB, LipL32, LipL41 e OmpL1 entre outras). Tais fatores estão presentes nas espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, e ausentes nas saprófitas (Shang et al., 1996; Barnett et al., 1999; Haake et al., 1999; Matsunaga et al., 2003; Cerqueira et al., 2009). Muitas estratégias foram capazes de induzir proteção parcial e algumas, total, embora nenhuma tenha sido comercializada até o momento (Dellagostin et al., 2011).

Atualmente busca-se estratégias que possibilitem o desenvolvimento de uma resposta imune duradoura e que induza proteção cruzada entre vários sorovares

através de novos adjuvantes, vias de apresentação de antígenos ou fusão/coadministração de antígenos.

Aqueles cuja profissão eventualmente requer exposição a solo ou água contaminados devem atentar ao uso de equipamentos de proteção individual (botas e luvas, por exemplo). Já no contexto recreativo, deve-se evitar o contato com coleções hídricas ou animais que estejam potencialmente contaminados ou infectados, respectivamente, principalmente durante período de grandes chuvas (Brasil, 2010; Hochedez et al., 2013)

2.1.5 Tratamento

Devido ao amplo espectro de sintomas e severidade da doença, as formas de tratamento também variam. Via de regra, a leptospirose é tratada com antibióticos para eliminação do agente etiológico, como doxiciclina, ceftriaxona, cefotaxima, cefalosporinas, eritromicina, estreptomicina ou ampicilina. Os antibióticos de eleição são as penicilinas, tanto para adultos como crianças, por um período de 5 a 7 dias. Alternativamente, doxiciclina também é utilizada pelo mesmo período, em menor dosagem, porém não deve ser usada em portadores de nefro e hepatopatas e gestantes (Brasil, 2010; Ricaldi & Vinetz, 2006).

Nos casos mais graves da doença, a principal causa de morte são falência de rins e fígado e hemorragia. Nesses cenários, é realizado também tratamento sintomático. No caso de problemas renais, é realizada diálise até volta da função renal normal (Goris et al., 2013). Problemas hepáticos são tratados por dieta livre de proteínas e restauração do balanço eletrolítico. Suporte cardiorrespiratório também é empregado em casos mais graves que afetem a capacidade pulmonar (síndrome hemorrágica aguda). Tratamento para hemorragias é realizado pela transfusão de sangue e administração de vitamina K (De Brito et al., 1979; Plank & Dean, 2000; Gouveia et al., 2008).

Em animais, pode-se usar tanto estreptomicina como tetraciclina, podendo ser combinada com ampicilinas. Oxitetraciclina pode ser usada alternativamente (Faine et al., 1999).

2.2 O agente: *Leptospira* spp.

2.2.1 Taxonomia

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, juntamente com os gêneros *Leptonema* e *Turneriella*. A divisão entre espécies se dá pela hibridização de DNA (Bharti et al., 2003). Atualmente existem 10 espécies patogênicas, 5 intermediárias e 6 saprofíticas, totalizando 21 espécies (Bourhy et al., 2014).

Além disso, membros do gênero *Leptospira* se dividem também em sorovares com base em diferenças antigênicas nos carboidratos do antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS). Os sorovares que apresentam certo grau de identidade são agrupados em sorogrupos. Até o momento, já foram descritos mais de 260 sorovares e mais de 30 sorogrupos patogênicos (Levett, 2001).

2.2.2 Microbiologia

Membros do gênero *Leptospira* são aeróbios obrigatórios, móveis, com formato espiralado com diâmetro de aproximadamente 100 nm e comprimento de até 20 µm. Possuem 2 flagelos axiais no espaço periplasmático, responsável por sua motilidade (Ko et al., 2009).

Leptospiras possuem configuração similar a bactérias Gram negativas, com parede celular composta por peptidoglicano intimamente associado à membrana interna e revestido por uma membrana externa, que apresenta várias lipoproteínas e LPS. As OMPs e lipoproteínas usadas como potenciais alvos vacinais e para diagnóstico estão ancoradas na membrana externa (Barnett et al., 1999; Faine et al., 1999; Levett, 2001).

Leptospiras são cultivadas tanto em meio líquido como semissólido e sólido, obtendo energia de ácidos graxos de cadeia longa por beta-oxidação e necessitam a presença de vitaminas B2 e B12, bem como ferro e sais de amônia (Faine et al., 1999). A temperatura e pH ótimos para o cultivo de *Leptospira* é aproximadamente 30°C e entre 7,2 e 7,4, respectivamente, com um tempo de geração de aproximadamente 12 horas (Faine et al., 1999). Em meios de cultura comerciais, os ácidos graxos de cadeia longa são oferecidos na forma de Tween 80 com adição de albumina sérica bovina para diminuir a toxicidade do detergente. Pode-se também empregar soro de coelho como suplemento para algumas cepas. A visualização é

feita por microscopia em campo escuro devido às características morfológicas da bactéria.

Agentes seletivos são frequentemente empregados na obtenção de novos isolados e para descontaminação de cultivos já estabelecidos. Usa-se 5-fluoruracil como antibiótico, ao qual leptospirosas apresentam resistência por não incorporarem pirimidinas (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

2.2.3 Aspectos epidemiológicos

Casos de leptospirose estão associados a regiões de clima tropical ou subtropical, uma vez que calor e umidade favorecem a sobrevivência de leptospirosas no ambiente. Em países desenvolvidos, o contato com água ou solo contaminados com a urina de animais infectados está relacionada a atividades recreativas, ao passo que em países subdesenvolvidos a principal causa é a falta de saneamento básico e infraestrutura, causando exposição a enchentes. Atividades profissionais também podem levar à exposição de áreas alagadas, aumentando a chance de contágio (Ko et al., 1999; Barcellos et al., 2003; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005; Hochedez et al., 2013).

Cada sorovar está adaptado a uma espécie animal, na qual tem mais chance de causar uma infecção crônica com menos danos ao hospedeiro, chamado hospedeiro mantenedor, de forma a aumentar a disseminação no meio ambiente e eventual infecção humana, considerada acidental e final. Murinos são resistentes à leptospirose, tornando-se os principais disseminadores do patógeno no ambiente e são considerados mantenedores do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, o principal causador de leptospirose em humanos no Brasil (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000).

Atualmente, são estimados 873.000 casos de leptospirose severa em todo o mundo com aproximadamente 49.000 mortes (Picardeau et al., 2014), embora o número provavelmente seja maior uma vez que muitos casos não são diagnosticados ou confundidos com outras enfermidades como gripe, dengue e malária entre outros. Nesse contexto, a leptospirose torna-se, também, uma zoonose negligenciada.

O conhecimento de quais sorovares são endêmicos a uma determinada população desempenha papel crucial na prevenção à doença. Desse modo, pode-se

tanto incluir ou excluir sorovares de formulações vacinais compostas por bacterinas para traçar uma estratégia de vacinação de animais que vise tentar diminuir a disseminação do patógeno em áreas habitadas por esses animais portadores.

Cepas de *Leptospira* de diversas espécies e sorovares distintos já foram isoladas em Pelotas. Dentre elas, cabe citar 3 isolados de *Leptospira noguchii* sorovares Autumnalis, Bataviae e Australis obtidos de humanos e ovinos (Silva, Cerqueira, et al., 2009), uma cepa de *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis isolada de gambá (Jorge, Hartleben, et al., 2012), 3 cepas de *L. interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni isolados de preá, capivara e canino (Jorge, Monte, et al., 2012; Monte et al., 2013), uma cepa de *L. borgpetersenii* sorogrupo Balum isolada de camundongo (Silva et al., 2010) e 2 cepas de *L. kirschneri* sorogrupo Pomona sorovar Mozdok isoladas de canino e humano (resultados ainda não publicados – Anexo B). Além disso, levantamentos soroepidemiológicos revelaram a presença de anticorpos contra os sorovares Australis, Autumnalis, Bratislava e Panama em capivaras abatidas no Rio Grande do Sul (Silva, Seyffert, et al., 2009), e contra os sorovares Bratislava, Canicola, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae em caninos com suspeita de leptospirose (Jorge, Hartleben, et al., 2012).

2.3 Técnicas para a caracterização de isolados de *Leptospira*

2.3.1 Caracterização da virulência

A virulência de isolados de *Leptospira* é caracterizada pela inoculação de diluições decimais (base 10) abrangendo 10^8 a 10^0 células. Essas diluições são inoculadas tanto em hamsters machos quanto fêmeas e os dias de óbitos são anotados. Essas diluições possibilitam calcular a quantidade de células necessárias para levar 50% da população inoculada com determinada diluição a óbito (DL_{50}). Também são observados sinais clínicos como desidratação, prostramento, pelos eriçados, falta de apetite e perda de peso. Análises histopatológicas de tecidos renal, hepático e pulmonar são realizadas para determinar a severidade da infecção (Diniz et al., 2011). Finalmente, pode-se realizar a técnica de *imprint* ou RT-PCR para confirmação da presença de leptospiros nos órgãos supracitados (Chagas-Junior et al., 2009; Chagas-Junior et al., 2012) e cultivo de tecido renal para

reisolamento do patógeno. No caso de poucos animais disponíveis, também pode-se fazer um único grupo inoculado com 10^8 células (Jorge, Hartleben, et al., 2012; Monte et al., 2013).

Esforços para diminuir o número de animais empregados em experimentos têm sido feitos. Nesse sentido, têm-se realizado imunofluorescência indireta para detecção da expressão de fatores de virulência e caracterização da virulência de isolados de *Leptospira* usando tanto anticorpos monoclonais como soros hiperimunes policlonais contra LigA, LigB e LipL32 (Fernandes et al., 2007; Monte et al., 2011; Jorge, Monte, et al., 2012).

2.3.2 Caracterização sorológica

A caracterização sorológica de isolados de *Leptospira* é realizada com base em duas técnicas principais: aglutinação microscópica (MAT) e *cross agglutinin adsorption test* (CAAT). Ambas técnicas são laboriosas e com interpretação subjetiva, sendo realizadas somente em poucos laboratórios de referência (Babudieri, 1971; Faine et al., 1999; Levett, 2001).

O MAT é usado para avaliar o título de anticorpos de um indivíduo ou animal contra determinado sorovar de *Leptospira* e é considerado padrão para diagnóstico de leptospirose. A técnica é realizada em 2 etapas: primeiramente é feita a triagem, usando uma baixa diluição do soro, contra vários sorovares. Posteriormente, é feita a titulação do soro contra os sorovares que reagiram na primeira etapa. O resultado é expresso como a diluição que for capaz de aglutinar mais de 50% das leptospiras presentes após 2 horas de incubação. A leitura é feita em microscópio de campo escuro (Faine et al., 1999).

O CAAT é realizado observando-se a aglutinação de uma cepa desconhecida, com soro de coelho previamente adsorvido com antígenos de uma cepa de referência. Caso o título de aglutinação com o soro adsorvido seja de até 10% do título com o soro não adsorvido, a cepa desconhecida é considerada do mesmo sorovar daquela usada para adsorção (cepa de referência). No caso de haver um título maior do que 10% do título original, essa nova cepa é considerada como um sorovar diferente da cepa de referência, podendo também ser descrita como um novo sorovar. Na hipótese de haver menos de 10% do título da cepa desconhecida com soros adsorvidos em cepas de referências diferentes, a cepa

desconhecida é designada como pertencente ao mesmo sorovar daquele que apresentou a menor percentagem (Babudieri, 1971; Faine et al., 1999).

Em ambas as técnicas, deve-se atentar para o tempo de cultivo e sua concentração, pois leptospiros possuem a capacidade de se auto aglutinarem, acarretando em falsos resultados. Além disso, deve-se observar a qualidade do soro usado, uma vez que, no caso do MAT, é possível que ainda não haja anticorpos num estágio inicial de infecção e, no caso do CAAT, é difícil a produção de lotes iguais de soros (Babudieri, 1971). Em ambos os casos há a possibilidade de laboratórios não possuírem cepas representativas de todos os sorovares que deveriam ser empregadas, o que pode resultar em resultados falso-negativos.

2.3.3 Técnicas moleculares

As primeiras técnicas moleculares desenvolvidas para caracterização de leptospiros foram hibridização de DNA e sequenciamento do gene *rrs* (16S) (Merien et al., 1992; Faine et al., 1999). Atualmente, outros genes podem ser usados para sequenciamento e determinação da espécie como *secY* e *rpoB* (La Scola et al., 2006; Victoria et al., 2008). Técnicas de *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) também foram desenvolvidas (Gerritsen et al., 1995; Natarajaseenivasan et al., 2004), embora não sejam frequentemente empregadas.

Atualmente há técnicas moleculares mais eficientes para caracterização de isolados de *Leptospira*. As técnicas supracitadas estão limitadas ao nível de espécie, ao passo que *multi loci variable number of tandem repeats analysis* (MLVA), eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE) e *multi loci sequence typing* (MLST) permitem a identificação ao nível de espécie, sorogrupo e sorovar (Majed et al., 2005; Salaün et al., 2006; Galloway & Levett, 2010; Boonsilp et al., 2013).

A técnica de MLVA consiste em amplificar *loci* que apresentem tamanhos variáveis, nos quais uma determinada sequência se repete diferentes vezes de acordo com a classificação do isolado. O número de repetições é estimado por eletroforese em gel de agarose conhecendo-se o tamanho do fragmento amplificado, o tamanho da sequência que se repete e o tamanho dos fragmentos que flanqueiam o *locus* em questão. A maioria dos sorovares de *Leptospira* apresenta um perfil

diferente de número de repetições para cada *loci*, embora alguns sorovares limitem o poder discriminatório da técnica, apresentando perfis iguais (*Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*; Mozdok e Tsaratsovo). Essa técnica é limitada a *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. borgpetersenii* (Majed et al., 2005; Salaün et al., 2006).

PFGE foi validada como uma alternativa à técnica de CAAT comparando-se os padrões obtidos após digestão do DNA genômico de *Leptospiras* com a enzima *NotI* à classificação proveniente de CAAT. Dos 175 isolados clínicos usados para validação de PFGE, houve 78% de concordância com CAAT, sendo os demais possivelmente novos sorovares. Além disso, PFGE proporciona resultados reprodutíveis e objetivos, em contraste aos métodos sorológicos. Diferentemente de MLVA, PFGE abrange todas as espécies patogênicas (Romero et al., 2009; Galloway & Levett, 2010).

A técnica de MLST foi primeiramente adaptada para o gênero *Leptospira* em 2006 por Ahmed (Ahmed et al., 2006). Posteriormente, a mesma foi refinada e aperfeiçoada (Boonsilp et al., 2013), sendo a que vigora atualmente (<http://leptospira.mlst.net/>). Ainda em 2014, os esquemas mais empregados em MLST foram avaliados com o intuito de selecionar os melhores *loci* (Varni et al., 2014). MLST consiste em identificar alelos em 7 *loci* e, a partir daí, traçar um perfil designado como *sequence type* (ST), que corresponde a uma espécie, sorogrupo e sorovar, embora uma classificação possa ter mais de um ST. Essa técnica abrange as espécies patogênicas responsáveis pela maioria dos casos de leptospirose (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* and *L. alexanderi*) (Boonsilp et al., 2013).

2.4 Os genomas de *Leptospira* spp.

O sequenciamento dos genomas de espécies membro do gênero *Leptospira* permite entender evolução, fatores envolvidos na patogenicidade e fisiologia destes organismos. Destacam-se os genomas de *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovares *Lai* e *Copenhageni*, *L. borgpetersenii* sorovar *Hardjo* e *L. biflexa* sorovar *Patoc1*, sobre os quais, estudos comparativos permitiram avanços nas áreas acima mencionadas. Os referidos avanços podem ser de extrema importância também no desenvolvimento de novas vacinas e testes de

diagnóstico (Ren et al., 2003; Nascimento, Ko, et al., 2004; Nascimento, Verjovski-Almeida, et al., 2004; Bulach et al., 2006; Picardeau et al., 2008).

O genoma do sorovar Lai é distribuído em 2 cromossomos: um com 4,33 Mb e, o outro, com 359 kb. Ao total, foram estimados 4.768 genes. Não foi descrito nenhum plasmídeo (Ren et al., 2003). Genes que codificam sistemas de transporte, sistemas regulatórios, transdução de sinal e quimiotaxia foram descritos, explicando a capacidade de sobrevivência das leptospiros, bem como sua capacidade de responder a diversos estímulos ambientais (Nascimento, Verjovski-Almeida, et al., 2004).

Diferenças interessantes foram encontradas em trabalho comparativo entre os genomas dos sorovares Lai e Copenhageni. Dentre elas, diferenças estruturais e grande variação no número e distribuição de sequências de inserção. Genes que codificam para adesinas afimbriais, importantes em estágio iniciais de infecção, foram identificados. Notavelmente, foram identificadas diferenças nos genes que codificam proteínas das rotas biossintéticas do antígeno O do LPS entre os dois sorovares, o que pode estar relacionado com a adaptação de cada sorovar a hospedeiros diferentes (Nascimento, Ko, et al., 2004).

As diferenças entre *L. borgpetersenii* de *L. interrogans* variam tanto no meio de transmissão como em sua distribuição na natureza. Essas diferenças são refletidas no genoma de *L. borgpetersenii*, que é aproximadamente 700 quilobase menor e possui mais regiões intergênicas, indicando a redução do genoma por sequências de inserção. As principais funções perdidas nesse processo foram perda de sensibilidade ambiental e transporte e utilização de nutrientes. Tais fenômenos indicam que *L. borgpetersenii* tende a tornar-se uma espécie cuja transmissão depende de contato direto entre os hospedeiros, em contraste com *L. interrogans*, que é capaz de sobreviver por longos períodos no ambiente até encontrar outro hospedeiro (Bulach et al., 2006).

O genoma de *L. biflexa* apresenta alta densidade gênica e baixa presença de elementos móveis, dificultando incorporação de DNA obtido por transferência horizontal. De forma contrastante, o genoma de espécies patogênicas apresentam menor densidade gênica, embora ainda alta, e maior presença de elementos móveis, aumentando a recombinação entre sequências de inserção. Análise comparativa do genoma de *L. biflexa*, uma espécie saprofítica, com as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* permitiu identificação de genes

essenciais para a patogenicidade, uma vez presentes nas duas últimas, mas ausentes na primeira (Picardeau et al., 2008).

Mais recentemente, foi sequenciado o genoma de *L. licerasiae*, uma espécie intermediária. Análise comparativa com outros genomas de *Leptospira* indica a existência de um cerne genômico composto por 1.547 genes presentes em todas as espécies e mais 452, conservados em espécies patogênicas e intermediárias. O *locus* com genes relacionados ao antígeno O do LPS é significativamente menor em comparação a *L. interrogans*: 6 e mais de 90, respectivamente. Essa informação pode proporcionar novos entendimentos em relação ao comportamento de espécies patogênicas, intermediárias e saprofitas. A capacidade de transferência horizontal de DNA também foi identificada nessa espécie, tornando-a mais próxima a espécies patogênicas do que a espécies saprofitas (Ricaldi et al., 2012).

Atualmente, há um projeto em andamento que visa sequenciar o genoma de até 200 espécies/sorovares de *Leptospira* que representem as espécies e sorovares de importância clínica em todo o mundo. Através disso, propõe-se a identificação de marcadores que possibilitem diferenciar a espécie infectante em amostras clínicas, sem necessidade de isolamento, proporcionar um novo entendimento da estrutura do antígeno O do LPS que permita identificar o sorovar sem análise sorológica, e elucidar mecanismos de patogenicidade e fatores determinantes de prognóstico pela relação de virulência e polimorfismos [<http://gsc.jcvi.org/projects/gsc/leptospira/index.php>].

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Há espécies e sorovares de *Leptospira* circulantes em Pelotas ainda não descritos na literatura.

3.2 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar *Leptospira* spp. de pacientes humanos com quadro clínico compatível com a fase aguda de leptospirose na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.3 Objetivos Específicos

- Coletar amostras de sangue total de pacientes com quadro clínico característico da fase aguda de leptospirose;
- Obter isolados de *Leptospira* spp. através do cultivo de amostras suspeitas em EMJH;
- Verificar a presença de anticorpos aglutinantes através de soroaglutinação microscópica com os soros obtidos;
- Caracterizar os isolados quanto à espécie e sorovar através de sequenciamento do gene *secY* e MLST;
- Realizar o sequenciamento do genoma dos isolados;
- Avaliar a virulência através da inoculação em modelo animal hamster.

4 CAPÍTULOS

4.1 Relatório de Atividades

4.1.1 Material e Métodos

4.1.1.1 Critérios de inclusão e definição de fase aguda

Foram incluídos no estudo aqueles pacientes que apresentaram sintomas compatíveis com a fase aguda leptospirose e procuraram auxílio médico em até uma semana após o surgimento dos sintomas, além de relatarem contato com animais (ratos, cães, bovinos, suínos) ou fatores de risco (coleções hídricas, inundações).

No presente estudo, consideraram-se como sintomas da fase aguda de leptospirose dor de cabeça, febre, mialgia (especialmente panturrilhas), artralgia e mal-estar (Faine et al., 1999).

4.1.1.2 Obtenção de amostra clínica para isolamento

Pacientes com quadro clínico compatível com a fase aguda de leptospirose foram convidados a fornecer amostra de sangue total para levantamento epidemiológico e isolamento de *Leptospira* spp., estando os mesmos de acordo com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo A).

Aproximadamente 10 mL de sangue foram coletados através de punção venosa com seringa e agulha por enfermeira e acondicionado em tubo Falcon 15 mL para obtenção de soro por centrifugação (10 min, 3.000 x g). Os soros serão usados para realização de MAT.

4.1.1.3 Cultivo de *Leptospira* spp.

Leptospira sp. foi cultivada em meio Ellinghause-McCullough-Johnson-Harris (EMJH – Difco) líquido ou semi-sólido suplementado com 10% Leptospira Enrichment EMJH (Difco) e 200 µg/mL de 5-fluoruracil. Os cultivos foram mantidos em estufa B.O.D a 30 °C sem agitação. O congelamento foi feito pela adição, em

concentração final de 10%, de glicerol ao cultivo em fase log de crescimento e armazenamento em nitrogênio líquido.

Nas primeiras passagens *in vitro*, fez-se necessária a suplementação do meio de cultura com 5% de soro fetal bovino para viabilizar o crescimento, embora o mesmo tenha tornado-se dispensável posteriormente.

4.1.1.4 Isolamento de *Leptospira*

O isolamento de *Leptospira* spp. foi realizado inoculando-se algumas gotas da amostra de sangue em meio EMJH em triplicata e, após incubação de 30 min, repicado para cultivo em três diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) conforme previamente descrito. Ao apresentar crescimento, o cultivo foi repicado para congelamento, extração de DNA genômico e caracterização do isolado.

4.1.1.5 Soroaglutinação microscópica

O ensaio de soroaglutinação microscópica foi realizado conforme previamente descrito (Faine et al., 1999; Levett, 2001). Somente o isolado obtido neste estudo foi empregado como antígeno para este ensaio. A preparação do mesmo se deu cultivando-se o isolado em meio líquido EMJH suplementado por período de 5 a 7 dias conforme previamente descrito até atingir concentração de aproximadamente 1 a 2×10^8 células por mililitro. Soros obtidos neste estudo em diluição final 1:50 foram avaliados incubando-os (2 h, 30 °C) com 50 µL do cultivo na concentração acima descrita. A presença ou não de células aglutinadas foi avaliada por microscopia em campo escuro. As amostras que apresentaram mais de 50% de aglutinação foram tituladas seguindo a metodologia descrita acima com diluições seriadas de base 2 até atingir 1:51.200.

4.1.1.6 Sequenciamento e análise genômica

O DNA genômico do isolado foi sequenciado usando a tecnologia *paired-end* e a plataforma illumina® Solexa. A montagem do genoma foi realizada empregando os softwares Velvet (Zerbino & Birney, 2008), Ray (Boisvert et al., 2010) e CLC

Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>). As *contigs* geradas pelos diferentes montadores foram integradas pelo software *CISA* (Lin & Liao, 2013) e ordenadas com base nos cromossomos I e II do genoma de *Leptospira interrogans* cepa L1-130 (GenBank: AE016823 e AE016824) com a ferramenta *Mauve* (Rissman et al., 2009). A ferramenta *IMAGE* (Tsai et al., 2010) foi utilizada para a extensão das *contigs* em ambos os cromossomos.

A anotação do genoma foi realizada com o software *Square* (<http://sourceforge.net/projects/sqgenome/>) para identificação dos genes codificantes de proteínas e tRNAs. O programa *RNAmmer* (Lagesen et al., 2007) foi empregado para a busca por sequências de RNAs ribossômicos. A representação gráfica do genoma foi gerada pelo *DNAPlotter* (Carver et al., 2009).

4.1.1.7 Caracterização molecular

A patogenicidade do isolado foi confirmada pela amplificação do gene *lipL32*, presente somente em *Leptospira* spp. patogênicas (Haake et al., 2000). A PCR foi realizada com os *primers* 5'-CCGCTCGAGGGTGGTCTGCCAAGCCT-3' e 5'-GGAATTCTTACTTAGTCGCGTCAGAAGC-3' (*forward* e *reverse*, respectivamente) utilizando programa com desnaturação inicial de 5 min (95 °C), 35 ciclos de desnaturação (95 °C), anelamento (50 °C) e extensão (72 °C), todos por um período de 30 s, e extensão final de 7 min (72 °C). A amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A sequência do gene *secY* foi obtida do genoma sequenciado usando os primers *SecYII* e *SecYIV* (Victoria et al., 2008) e alinhada com as sequências depositadas no GenBank através da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para definição da espécie do isolado. Os genes *rrs* e *rpoB* também foram avaliados quanto sua capacidade para determinar a espécie do isolado (Merien et al., 1992; La Scola et al., 2006). Os iniciadores usados para o esquema atual de *multi loci sequence typing* (MLST) (Boonsilp et al., 2013) disponíveis em <http://leptospira.mlst.net/misc/info.asp> foram empregados para identificar os alelos de cada *loci* usado nesta técnica. Em seguida, os mesmos foram cruzados com o banco de dados disponível no mesmo sítio, gerando um *sequence type* (ST). A técnica de MLVA também foi avaliada (Salaün et al., 2006).

A taxonomia do isolado obtido neste estudo foi analisada através do programa MEGA (Tamura et al., 2013). Sequências concatenadas dos STs representativos de isolados de Pelotas (Silva et al., 2008; Silva, Seyffert, et al., 2009; Silva, Cerqueira, et al., 2009; Diniz et al., 2011; Jorge, Hartleben, et al., 2012; Jorge, Monte, et al., 2012; Forster, Hartwig, Seixas, McBride, et al., 2013; Monte et al., 2013) foram usadas para gerar uma árvore filogenética pelo método de Neighbour-Joining. STs referentes a cepas de referência (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130 e *L. kirschneri* sorovar Mozdok cepa 5621) também foram empregadas como controle.

4.1.1.8 Imunofluorescência indireta

A imunofluorescência indireta foi realizada conforme previamente descrito por (Monte et al., 2011). Brevemente, aproximadamente 20 µl de cultivo em fase log de crescimento (10^8 células/mL) do isolado foram secos em lâminas para imunofluorescência. A membrana das bactérias foi permeabilizada pela incubação com metanol a -20 °C por 20 min. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado através da incubação com PBST + 10% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 h a 30 °C. Anticorpos policlonais de coelho anti-LipL32, anti-LigAni e anti-LigBni foram diluídos 1:200 em PBST + 1% de BSA e incubados na lâmina por 1 h a 30 °C. Anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com FITC diluído 1:200 foi usado como anticorpo secundário. O DNA das bactérias foi marcado com Hoestch por 30 min a 30 °C. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência a 450 nm para FITC e 350 nm para Hoestch.

4.1.1.9 Caracterização da virulência em modelo animal

O isolado foi cultivado conforme descrito anteriormente até atingir concentração de aproximadamente 10^8 células/mL. Três hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) com oito semanas de idade foram inoculados com 10^8 células do isolado via intraperitoneal e acompanhados diariamente por 28 dias, anotando-se sinais clínicos (febre, desidratação, hemorragia, falência renal e icterícia entre outros) e mortes. Dois animais foram inoculados com PBS estéril (controle negativo) e seguiram-se os mesmos

procedimentos pós-inoculação. Animais moribundos foram eutanasiados com injeção intravenosa, ou via intraperitoneal na impossibilidade da primeira, de solução de lidocaína em dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal após a administração de medicamento pré-anestésico conforme Resolução nº1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Os rins foram removidos assepticamente, macerados e cultivados em EMJH para re-isolamento das bactérias. Pulmão, fígado e rins foram removidos e armazenados em solução de formalina 10% tamponada (pH 7,0) e fixados em bloco de parafina. Seções de 5-6 µm de espessura coradas com hematoxilina eosina foram usadas para exames histopatológicos. A presença de *Leptospira* nos rins, fígado e pulmões foi detectada pela técnica de *imprint* segundo metodologia previamente descrita (Chagas-Junior et al., 2009).

4.1.2 Resultados

4.1.2.1 Obtenção de um isolado de *Leptospira* sp.

Coletou-se amostras de sangue de 25 pacientes na tentativa de isolamento conforme previamente descrito. Destes, apenas um apresentou crescimento. A paciente da qual foi possível isolamento era do sexo feminino, 56 anos, e apresentou dor de cabeça, dor nas pernas, panturrilha e articulações, fadiga/cansaço, febre, mialgias, náuseas e sonolência e relatou contato com coleções hídricas, roedores, caninos e bovinos.

Após aproximadamente 3 meses de incubação, foi possível verificar a presença de espiroquetas no cultivo, que foi então repicado para meio semissólido para armazenamento e líquido para extração de DNA, congelamento, testes de virulência e caracterização. O isolado foi denominado 61H. Amplificação do gene *lipL32* confirmou que tratava-se de uma espécie patogênica (Figura 1).

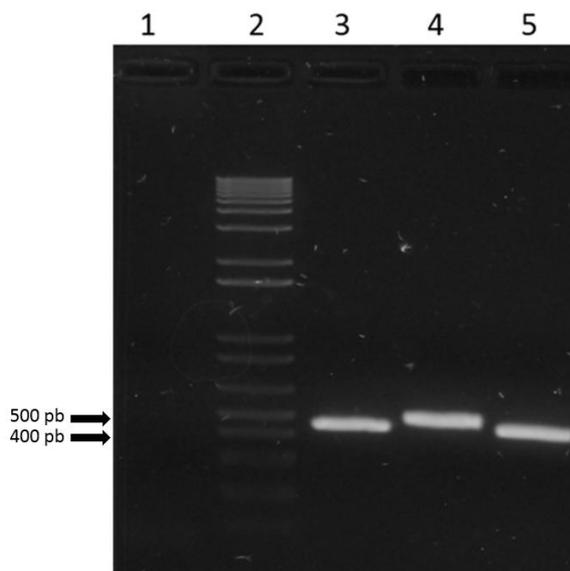


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando amplificação do gene *lipL32* do isolado obtido. 1: Controle negativo da PCR (H₂O); 2: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen); 3: *Leptospira interrogans* RCA; 4: *Leptospira kirschneri* 61H; 5: *Leptospira interrogans* L1-130.

4.1.2.2 Soroaglutinação microscópica

Todos os 25 soros obtidos foram testados por MAT usando o isolado como antígeno. Destes, 13 apresentaram reação no MAT de triagem com diluição 1:50. Diluições seriadas de base 2 foram feitas para titulação dos soros reagentes. Sete soros titulados não apresentaram reação na titulação e foram considerados negativos. Outros 5 soros apresentaram reação na titulação, mas sem 50% de aglutinação e foram considerados como tendo título de 50. Dois soros apresentaram título de 200, sendo um deles o soro do paciente do qual o isolado foi obtido.

4.1.2.3 Análise genômica

O ordenamento das *contigs* resultou em uma montagem de 3.738.643 pares de base para o cromossomo I e 335.634 para o cromossomo II, contendo 113 e 18 *gaps*, respectivamente. A figura 2 demonstra os mapas de ambos cromossomos. A anotação realizada pelo *Square* resultou na identificação de 3398 genes codificantes para proteínas, sendo 3104 presentes no cromossomo I e 294 no cromossomo II, e 39 sequências de RNAs transportadores. A busca por RNAs ribossômicos resultou

na identificação de uma única região codificadora contendo as três subunidades (5S, 16S e 23S).

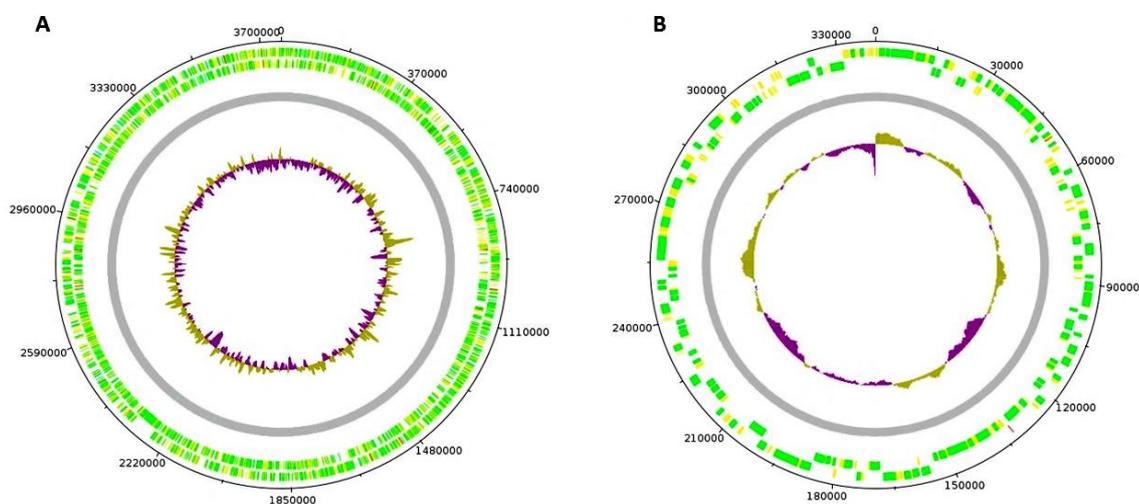


Figura 2. Mapas dos cromossomos I (painel A) e II (painel B) do isolado 61H. As barras verdes e amarelas indicam a presença de sequências codificadoras nas fitas *forward* (barras externas) e *reverse* (barras internas). As ondas amarelas escuras e roxas indicam a percentagem de conteúdo G+C.

A comparação dos dados do presente genoma e dos genomas já indexados no GenBank está representada na tabela 1. Uma pequena redução no tamanho do genoma foi observada, assim como uma alteração no conteúdo C+G em relação às demais cepas do mesmo sorovar. Este fato, associado a um menor número de sequências de RNAs ribossômicos, torna necessária uma revisão do processo de montagem, apesar do número de proteínas preditas e sequências de tRNAs observados ser próximo ao encontrado na cepa Tsaratsovo.

Tabela 1. Comparação dos dados do genoma do isolado 61H com os genomas de *Leptospira kirschneri* sorovar Mozdok depositados no GenBank.

Cepa	Tamanho (Mb)	C+G%	CDSs	tRNAs	rRNAs	Código de acesso
61H	4.07	34.6%	3398	39	1	
Vehlefans 2	4.41	35.9%	3576	37	6	NZ_AOW00000000.1
Vehlefans 3	4.40	35.9%	3566	37	5	NZ_AOK00000000.1
Brem 166	4.35	35.9%	3552	36	5	NZ_AHQI00000000.1
Tsaratsovo	4.25	35.9%	3394	37	3	NZ_AHQJ00000000.1

4.1.2.4 Caracterização molecular

A determinação da espécie do isolado humano como *Leptospira kirschneri* foi feita através de BLAST usando a sequência do gene *secY* (Victoria et al., 2008) a partir do genoma total sequenciado, apresentando 100% de homologia com as sequências depositadas no GenBank. Notavelmente, os 2 resultados encontrados com 100% de homologia com o gene *secY* são dos sorovares Mozdok e Tsaratsvo. Alinhamento do gene *rrs* apresentou resultados com 100% de homologia à *L. kirschneri*, mas de sorovares diferentes, incluindo também a cepa referência do sorovar Mozdok. De forma contrastante, alinhamento do gene *rpoB* apresentou somente 94% de identidade com isolados de *L. borgpetersenii*. Isolados de *L. kirschneri* apresentaram apenas 93% de identidade.

As sequências referentes à técnica de MLST (Boonsilp et al., 2013) foram obtidas a partir do genoma total já sequenciado. Alinhamento dos *loci* de MLST foi realizado com sequências já caracterizadas disponíveis em <http://leptospira.mlst.net/>. O isolado teve 100% de identidade com o *sequence type* 117 (ST 117), que corresponde a *L. kirschneri* sorogrupo Pomona sorovar Mozdok. A amplificação de qualquer *locus* empregado na técnica de MLVA não foi possível.

A técnica de imunofluorescência indireta para detecção da proteína LipL32 e as adesinas LigA e LigB foi empregada para caracterização *in vitro* de fatores de virulência do isolado. Houve reação contra todos os antígenos testados (Figura 4), indicando a virulência do isolado uma vez que as três proteínas estão envolvidas na patogênese (Haake et al., 2000; Matsunaga et al., 2003).

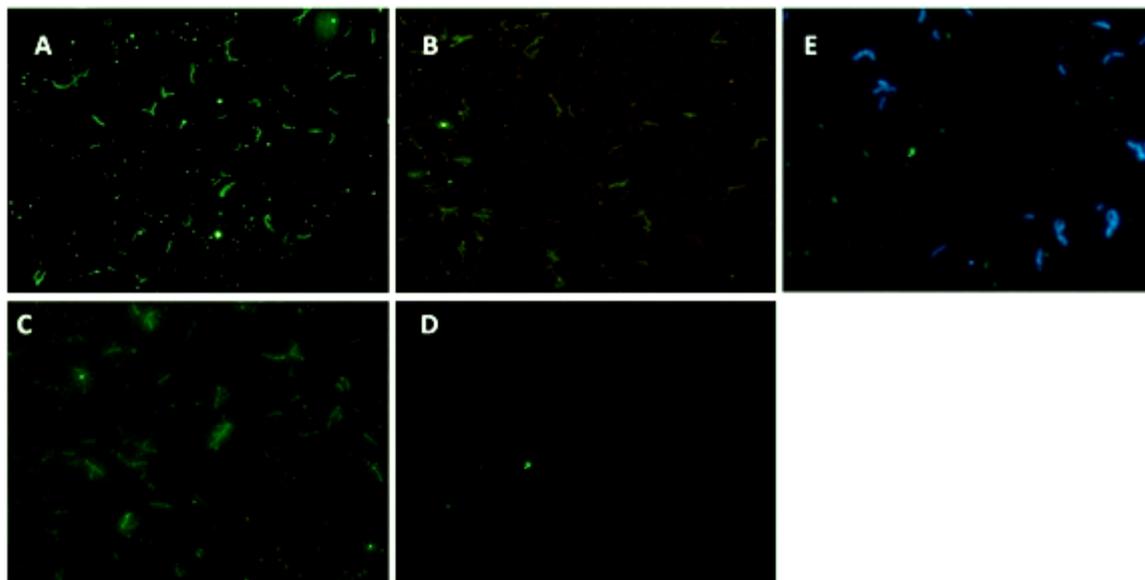


Figura 4. Imunofluorescência indireta para detecção de antígenos associados à membrana externa do isolado 61H. A: Anti-LipL32; B: Anti-LigAni; C: Anti-LigBni; D: Soro negativo de coelho; E: mesmo campo de D corado com Hoechst. Todos os campos estão aumentados 400 x.

Um animal inoculado com o isolado foi a óbito 5 dias após a infecção e, os outros 2 animais, após 7 dias. Análise macroscópica mostrou pulmão com várias petéquias, indicando hemorragia, o que foi posteriormente confirmado por histopatologia. Análise histopatológica dos rins apresentou congestão, hemorragia, infiltrado de células mononucleares, degeneração e necrose tubular, cilindros hialinos acometendo túbulos, glomérulos com conteúdo eosinófilo e hemácias e hemossiderina. Fígado apresentou degeneração difusa e hepatócitos fora do padrão de cordões. Pulmões apresentavam edemas, congestão e hemorragia com altos *scores* histopatológicos, enfisema, presença de fibrina nos alvéolos e hemossiderina. Os danos histopatológicos podem ser observados na figura 5.

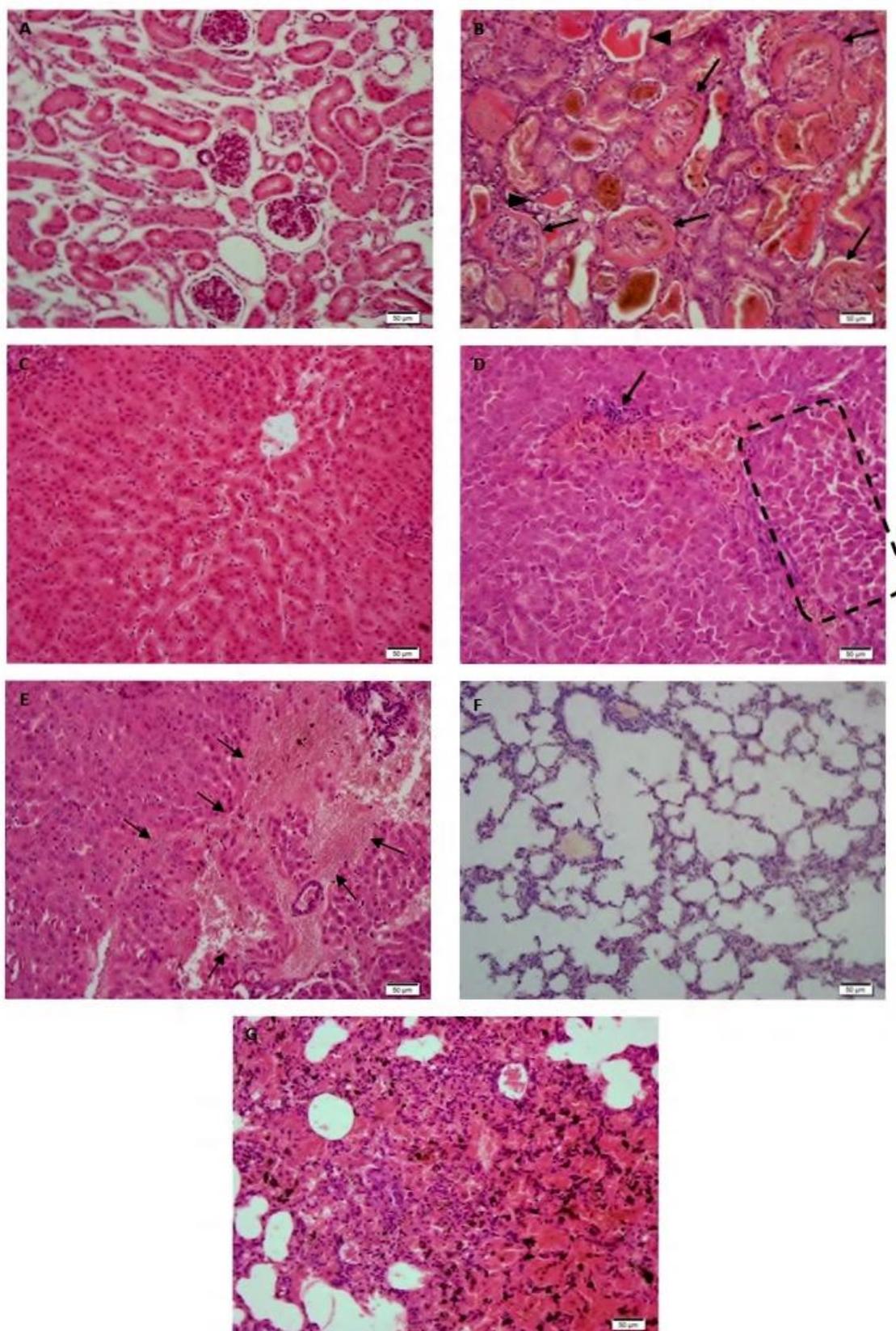


Figura 5. Análises histopatológicas mostrando seções de rim, fígado e pulmão de animais infectados com o isolado 61H. A: Rim sem alterações histopatológicas; B: Rim com glomerúlos congestionados e hemorrágicos (setas), grânulos de hemossiderina (pontos escuros), presença de cilindros hialinos (cabeça de seta) nos túbulos renais; C: Fígado sem alterações histopatológicas; D: Fígado com

infiltrado de leucócitos (seta), hepatócitos fora do padrão de cordões (linha pontilhada); E: Fígado apresentando congestão e hemorragia (setas); F: Pulmão sem alterações histopatológicas; e G: Pulmão apresentando edema, congestão e hemorragia, hemossiderina (grânulos pretos). Todas as fotos com imagem aumentada em 200 x. Barras representam 50 µm.

A técnica de *imprint* (Chagas-Junior et al., 2009) confirmou a presença de leptospiros nos rins, fígado e pulmão dos animais eutanasiados.

4.1.3 Discussão

O cultivo e isolamento de *Leptospira* spp. é um processo lento e que, no caso do isolamento, pode apresentar baixa taxa de sucesso por determinadas cepas requererem suplementação adicional do meio de cultura com piruvato ou soro de coelho (Levett, 2001).

A estimativa da Organização Mundial da Saúde é de que há aproximadamente 873.000 casos de leptospirose humana por ano, com uma taxa de mortalidade superior a 5% (Picardeau et al., 2014). *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* são as espécies responsáveis pela maioria dos casos em humanos (Boonsilp et al., 2013). A maioria dos casos descritos no Brasil são causados por *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000). O único caso de *L. kirschneri* em infecções humanas no Brasil está associado ao sorogrupo Grippothyphosa, não considerado endêmico no país (Pereira et al., 2000).

O sorovar Mozdok, pertencente ao sorogrupo Pomona, foi inicialmente isolado de um rato do campo (*field vole* – *Microtus agrestis*) na Rússia em 1961 (informação disponível em <http://leptospira.mlst.net/portable/portable.xls>). Pequenos roedores são considerados os animais reservatórios para o sorovar Mozdok (Ellis, 2010), que é endêmico nesses animais na Croácia (Majetic et al., 2014) e responsável por infecção de animais domésticos por toda Europa (Ellis, 2010; Renaud et al., 2013). Embora o sorogrupo Pomona seja endêmico em humanos na Croácia, o sorovar Mozdok nunca foi identificado em infecções humanas naquele país (Majetic et al., 2014). Há somente um relato de leptospirose humana causada pelo sorovar Mozdok em todo o mundo (Obregón et al., 2007). Além disso, esse sorovar foi isolado de um canino assintomático na região de Pelotas há aproximadamente quatro anos (Anexo B).

Este é o primeiro isolado obtido de um paciente humano no Hemisfério Sul e o segundo em todo o mundo. O isolamento deste sorovar de um canino há quatro anos e novamente de um humano pode indicar aclimatação do sorovar à região de Pelotas e que o mesmo está em circulação pela cidade. Além disso, cães assintomáticos carregando leptospiros patogênicas são de interesse para saúde pública, especialmente em uma cidade com mais de 20.000 animais de rua.

A hipótese de que o sorovar Mozdok é endêmico em Pelotas tem amparo no fato de outro paciente ter apresentado título de 200 contra referido sorovar. Esse título pode ser suficiente para considerar o paciente como doente de acordo com a OMS (WHO, 2003), embora seja ideal o uso de amostras pareadas para demonstrar o aumento no título de anticorpos, indicando infecção ativa. Deve-se considerar também que em áreas onde leptospirose é endêmica o título para diagnóstico de uma infecção ativa sem amostras pareadas é superior, como no caso de Salvador, onde considera-se um título 1.600 para diagnóstico (McBride, comunicação pessoal). Entretanto, deve-se ainda realizar MAT com a bateria de sorovares para garantir que o resultado aqui apresentado não seja reação cruzada com outro sorovar do mesmo sorogrupo. Além disso, recomenda-se a adição deste sorovar à bateria utilizada pelo Lacen.

O modo mais efetivo de combater a leptospirose é pela vacinação e medidas de saneamento básico. Entretanto, as vacinas disponíveis atualmente são bacterinas que conferem imunidade sorovar-específica e estão disponíveis somente em alguns países, além de apresentarem uma série de reações adversas (Dellagostin et al., 2011). Além disso, tais vacinas seriam efetivas somente em cenários nos quais a maioria dos casos são causados por um sorovar específico, como ocorre em Salvador e São Paulo (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000; McBride, et al., 2005). Por outro lado, em cenários como Pelotas, onde uma gama de sorovares é responsável pelos casos de leptospirose (Silva et al., 2008; Silva, Cerqueira, et al., 2009), novas vacinas capazes de conferir proteção cruzada entre os sorovares são uma necessidade. Nesse contexto, a caracterização de novos isolados clínicos ao nível de sorovar é de suma importância, não só para o desenvolvimento de novas vacinas, mas também para aprofundar o conhecimento epidemiológico sobre leptospirose. Este trabalho destaca a necessidade de proteção cruzada no combate à leptospirose, mostrando que sorovares ainda não descritos

em uma dada região podem ser introduzidos na mesma, seja ela rural ou urbana.

A diferença encontrada entre o tamanho do genoma do nosso isolado em comparação com outras cepas de *L. kirschneri* sorovar Mozdok pode ser explicada por erro de sequenciamento, artefato do protocolo de montagem do genoma ou ainda ter um significado biológico, o que será avaliado pela comparação de quais proteínas estão presentes ou ausentes em relação à *L. interrogans* cepa L1-130 e demais cepas já empregadas neste estudo, bem como a função das mesmas. A conservação de LigA e LigB também será avaliada.

4.1.4 Conclusão

Este é o primeiro relato de isolamento de *L. kirschneri* sorovar Mozdok no Hemisfério Sul, colocando-o como um dos sorovares prevalentes na população humana e animal de Pelotas, no sul do Brasil. Os dados epidemiológicos apresentados neste trabalho podem ser importantes tanto para o desenvolvimento de novas vacinas como para a criação de testes rápidos de diagnóstico.

5 CONCLUSÃO GERAL

Obtiveram-se 25 amostras de pacientes que se enquadraram na definição de leptospirose aguda. Destes, foi possível obter o isolamento de uma cepa pertencente ao sorovar Mozdok é inédito no Hemisfério Sul e possui importantes implicações epidemiológicas.

MAT empregando o isolado obtido como antígeno apresentou dois pacientes com título de 200. Entretanto, deve-se realizar MAT com toda a bateria de sorovares disponíveis para descartar a possibilidade de reação cruzada.

O gene *secY* se mostrou mais discriminatório para determinação da espécie em relação aos genes *rpoB* e *rrs*. A técnica de MLST se mostrou satisfatória e apresentaram concordância com o resultado obtido pelo sequenciamento dos genes *secY* e *rrs*, sendo indicadas para a caracterização de novos isolados. Os resultados encontrados neste estudo desencorajam o emprego de *rpoB* e MLVA para a caracterização de isolados de *L. kirschneri*. As técnicas empregadas para caracterizar a virulência do isolado se mostraram eficazes, caracterizando o isolado como altamente virulento ($DL_{50} = 170$ células).

Trabalhos de isolamento ou de vigilância que visem identificar os sorovares endêmicos em uma população são de importância crucial para o combate à leptospirose humana e animal, tanto por dar mais confiabilidade integrando bateria de MAT como isolado local e novo sorovar, quanto por auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas.

O protocolo de montagem e anotação para genomas de *Leptospira* spp. desenvolvido pelo Laboratório de Bioinformática deve ainda ser aperfeiçoado. Uma comparação mais detalhada do genoma do isolado com os genomas de outras cepas de referência ainda será realizada.

7 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140(3-4). p. 287–96.
- AHMED, A., LINDEN, H. VAN DER & HARTSKEERL, R.A. (2014). Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Pathogenic *Leptospira*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11. p. 4953–4964.
- AHMED, N., DEVI, S.M., VALVERDE, M.D.L.Á., VIJAYACHARI, P., MACHANG, R.S., ELLIS, W.A. & HARTSKEERL, R.A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 5(28). p. 1–10.
- BABUDIERI, B. (1971). Proposed standardization of the agglutination-adsorption test for *Leptospira*. *Bulletin of the World Health Organization*. 44(6). p. 795–810.
- BARCELLOS, C., LAMMERHIRT, C.B., ALMEIDA, M.A. & SANTOS, E. (2003). Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. *Cad Saúde Pública*. 19. p. 1283–1292.
- BARNETT, J.K., BARNETT, D., BOLIN, C. A, SUMMERS, T. A, WAGAR, E. A, CHEVILLE, N.F., HARTSKEERL, R. A & HAAKE, D. A (1999). Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infection and immunity*. 67(2). p. 853–61.
- BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICALDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT, M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J.M. (2003). Reviews Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*. 3. p. 757–771.
- BOISVERT, S., LAVIOLETTE, F. & CORBEIL, J. (2010). Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*. 17(11). p. 1519–33.
- BOONSILP, S., THAIPADUNGPANIT, J., AMORNCHAI, P., WUTHIEKANUN, V., BAILEY, M.S., HOLDEN, M.T.G., ZHANG, C., JIANG, X., KOIZUMI, N., TAYLOR, K., GALLOWAY, R., HOFFMASTER, A.R., CRAIG, S., SMYTHE, L.D., HARTSKEERL, R. A, DAY, N.P., CHANTRATITA, N., FEIL, E.J., AANENSEN, D.M., ET AL. (2013). A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS neglected tropical diseases*. 7(1). p. E1954.
- BOURHY, P., BREMONT, S., ZININI, F., GIRY, C. & PICARDEAU, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of clinical microbiology*. 49(6). p. 2154–60.

- BOURHY, P., COLLET, L., BRISSE, S. & PICARDEAU, M. (2014). *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 33(1).
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. (2010). *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso* 8th ed., Brasília: Ministério da Saúde.
- DE BRITO, T., BÖHM, G. & YASUDA, P. (1979). Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. *The Journal of Pathology*. 128(4). p. 177–82.
- BULACH, D.M., ZUERNER, R.L., WILSON, P., SEEMANN, T., MCGRATH, A., CULLEN, P. A., DAVIS, J., JOHNSON, M., KUCZEK, E., ALT, D.P., PETERSON-BURCH, B., COPPEL, R.L., ROOD, J.I., DAVIES, J.K. & ADLER, B. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(39). p. 14560–5.
- CANAL, E., POLLETT, S., HEITZINGER, K., GREGORY, M., KASPER, M., HALSEY, E., MEZA, Y., CAMPOS, K., PEREZ, J., MEZA, R., BERNAL, M., GUILLEN, A., KOCHER, T.J., ESPINOSA, B., HALL, E.R. & MAVES, R.C. (2013). Detection of human leptospirosis as a cause of acute fever by capture ELISA using a *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (M20) derived antigen. *BMC infectious diseases*. 13(1). p. 438.
- CARVER, T., THOMSON, N., BLEASBY, A., BERRIMAN, M. & PARKHILL, J. (2009). DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 25(1). p. 119–20.
- CERQUEIRA, G.M., MCBRIDE, A.J. A, PICARDEAU, M., RIBEIRO, S.G., MOREIRA, A.N., MOREL, V., REIS, M.G., KO, A.I. & DELLAGOSTIN, O. A (2009). Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. *Journal of medical microbiology*. 58(Pt 9). p. 1173–81.
- CHAGAS-JUNIOR, A.D., MCBRIDE, A.J. A, ATHANAZIO, D. A, FIGUEIRA, C.P., MEDEIROS, M. A, REIS, M.G., KO, A.I. & MCBRIDE, F.W.C. (2009). An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *Journal of medical microbiology*. 58(Pt 12). p. 1632–7.
- CHAGAS-JUNIOR, A.D., DA SILVA, C.L.R., SOARES, L.M., SANTOS, C.S., SILVA, C.D.C.M., ATHANAZIO, D. A, DOS REIS, M.G., MCBRIDE, F.W.C. & MCBRIDE, A.J. A (2012). Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR. *PloS one*. 7(2). p. E32712.
- CHAPPEL, R.J., GORIS, M., PALMER, M.F. & HARTSKEERL, R.A. (2004). Impact of Proficiency Testing on Results of the Microscopic Agglutination Test for Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*. 42(12). p. 5484–5488.

- CHIRATHAWORN, C., JANWITTHAYANAN, W., SEREEMASPUN, A., LERTPOCASOMBAT, K., RUNGPANICH, U., EKPO, P. & SUWANCHAROEN, D. (2014). Development of an immunochromatographic test with anti-LipL32-coupled gold nanoparticles for *Leptospira* detection. *The new microbiologica*. 37(2). p. 201–7.
- COUTINHO, M.L., CHOY, H. A, KELLEY, M.M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J.T., LEWIS, M.S., ALEIXO, J.A.G. & HAAKE, D. A (2011). A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS neglected tropical diseases*. 5(12). p. E1422.
- DELLAGOSTIN, O.A., GRASSMANN, A.A., HARTWIG, D.D., FÉLIX, S.R., DA SILVA, É.F. & MCBRIDE, A.J.A. (2011). Recombinant vaccines against leptospirosis. *Human vaccines*. 7(11). p. 1215–24.
- DENEKE, Y., SABARINATH, T., GOGIA, N., LALSIAMTHARA, J., VISWAS, K.N. & CHAUDHURI, P. (2014). Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. *Molecular and cellular probes*. 28(4). p. 141–6.
- DINIZ, J.A., FÉLIX, S.R., BONEL-RAPOSO, J., SEIXAS NETO, A.C.P., VASCONCELLOS, F.A., GRASSMANN, A.A., DELLAGOSTIN, O.A., ALEIXO, J.A.G. & DA SILVA, E.F. (2011). Highly virulent *Leptospira borgpetersenii* strain characterized in the hamster model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 85(2). p. 271–4.
- ELLIS, W.A. (2010). Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *The Veterinary record*. 167(16). p. 602–5.
- FAINE, S.B., ADLER, B., BOLIN, C.A. & PEROLAT, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis* 2nd ed., Melbourne: MediSci.
- FÉLIX, S.R., HARTWIG, D.D., ARGONDISO, A.P.C., SILVA, É.F., SEIXAS, F.K., NETO, A.C.P.S., MEDEIROS, M. A, LILENBAUM, W. & DELLAGOSTIN, O. A (2011). Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 18(12). p. 2026–30.
- FERNANDES, C.P.H., SEIXAS, F.K., COUTINHO, M.L., VASCONCELLOS, F. A, SEYFFERT, N., CRODA, J., MCBRIDE, A.J., KO, A.I., DELLAGOSTIN, O. A & ALEIXO, J. A G. (2007). Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. *Hybridoma*. 26(1). p. 35–41.
- FORSTER, K.M., HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., BACELO, K.L., AMARAL, M., HARTLEBEN, C.P. & DELLAGOSTIN, O. A (2013). A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 20(5). p. 725–31.
- FORSTER, K.M., HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., MCBRIDE, A.J. A, MONTE, L.G., RECUERO, A.L.C., BROD, C.S., HARTLEBEN, C.P., AMARAL, M. & DELLAGOSTIN, O. A (2013). Characterization of a virulent *Leptospira interrogans* strain isolated from an

abandoned swimming pool. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 44(1). p. 165–70.

- GALLOWAY, R.L. & LEVETT, P.N. (2010). Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS neglected tropical diseases*. 4(9).
- GERRITSEN, M. A, SMITS, M. A & OLYHOEK, T. (1995). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospires of serogroup Sejroe. *Journal of medical microbiology*. 42(5). p. 336–9.
- GONZÁLEZ, S., GEYMONAT, J.P., HERNÁNDEZ, E., MARQUÉS, J.M., SCHELOTTO, F. & VARELA, G. (2013). Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries*. 7(12). p. 941–945.
- GORIS, M.G. A, BOER, K.R., DUARTE, T. A T.E., KLIFFEN, S.J. & HARTSKEERL, R. A (2013). Human leptospirosis trends, the Netherlands, 1925-2008. *Emerging infectious diseases*. 19(3). p. 371–8.
- GOUVEIA, E.L., METCALFE, J., CARVALHO, A.L.F. DE & AIRES, T.S.F. (2008). Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 14(3). p. 1–4.
- GRASSMANN, A.A., FÉLIX, S.R., DOS SANTOS, C.X., AMARAL, M.G., SEIXAS NETO, A.C.P., FAGUNDES, M.Q., SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clinical and vaccine immunology*. 19(5). p. 740–5.
- HAAKE, D. A, CHAO, G., ZUERNER, R.L., BARNETT, J.K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P.N. & BOLIN, C. A (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and immunity*. 68(4). p. 2276–85.
- HAAKE, D. A, MAZEL, M.K., MCCOY, A M., MILWARD, F., CHAO, G., MATSUNAGA, J. & WAGAR, E. A (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and immunity*. 67(12). p. 6572–82.
- HARTWIG, D.D., BACELO, K.L., DE OLIVEIRA, P.D., OLIVEIRA, T.L., SEIXAS, F.K., AMARAL, M.G., HARTLEBEN, C.P., MCBRIDE, A.J. A & DELLAGOSTIN, O. A (2013). Mannosylated LigANI Produced in *Pichia pastoris* Protects Hamsters Against Leptospirosis. *Current microbiology*.
- HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., MCBRIDE, A.J. A & DELLAGOSTIN, O. A (2011). Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. *Current microbiology*. 62(4). p. 1337–41.

- HOCHEDÉZ, P., ESCHER, M., DECOUSSY, H., PASGRIMAUD, L., MARTINEZ, R., ROSINE, J., THEODOSE, R., BOURHY, P., PICARDEAU, M., OLIVE, C., LEDRANS, M. & CABIE, A. (2013). Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 18(18). p. 1–8.
- HUMPHRYES, P.C., WEEKS, M.E., ABUOUN, M., THOMSON, G., NÚÑEZ, A & COLDHAM, N.G. (2014). Vaccination with leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 reduces kidney invasion of *Leptospira interrogans* serovar canicola in hamsters. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 21(4). p. 546–51.
- INADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R. & ITO, H. (1916). THE ETIOLOGY , MODE OF INFECTION , AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTERHAEMORRHAGICA). *The Journal of experimental Medicine*. 1(23). p. 377–402.
- JORGE, S., HARTLEBEN, C.P., SEIXAS, F.K., COIMBRA, M. A A, STARK, C.B., LARRONDO, A.G., AMARAL, M.G., ALBANO, A.P.N., MINELLO, L.F., DELLAGOSTIN, O. A & BROD, C.S. (2012). *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): first isolation in Brazil. *Acta tropica*. 124(2). p. 147–51.
- JORGE, S., MONTE, L.G., COIMBRA, M.A., ALBANO, A.P., HARTWIG, D.D., LUCAS, C., SEIXAS, F.K., DELLAGOSTIN, O. A & HARTLEBEN, C.P. (2012). Detection of virulence factors and molecular typing of pathogenic *Leptospira* from capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Current microbiology*. 65(4). p. 461–4.
- KALUGALAGE, T., RODRIGO, C., VITHANAGE, T., SOMARATNE, P., DE SILVA, H.J., HANDUNNETTI, S. & RAJAPAKSE, S. (2013). Low serum total nitrite and nitrate levels in severe leptospirosis. *BMC infectious diseases*. 13. p. 206.
- KO, A.I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*. 7(10). p. 736–47.
- KO, A.I., REIS, M.G., DOURADO, C.M.R., JR, W.D.J. & RILEY, L.W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet infectious diseases*. 354. p. 820–825.
- LAGESEN, K., HALLIN, P., RØDLAND, E.A., STAERFELDT, H.-H., ROGNES, T. & USSERY, D.W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic acids research*. 35(9). p. 3100–8.
- LEVETT, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 14. p. 296–326.
- LEVETT, P.N., MOREY, R.E., GALLOWAY, R.L., TURNER, D.E., STEIGERWALT, A.G. & MAYER, L.W. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 54(1). p. 45–49.
- LIN, S.-H. & LIAO, Y.-C. (2013). CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes. *PLoS one*. 8(3). p. E60843.

- LOURDAULT, K., WANG, L.-C., VIEIRA, A., MATSUNAGA, J., MELO, R., LEWIS, M.S., HAAKE, D. A & GOMES-SOLECKI, M. (2014). Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infection and immunity*. 82(2). p. 893–902.
- MAJED, Z., BELLENGER, E., POSTIC, D., POURCEL, C., BARANTON, G. & PICARDEAU, M. (2005). Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Ssensu Stricto. . 43(2). p. 539–545.
- MAJETIC, Z.S., GALLOWAY, R., SABLJIC, E.R., MILAS, Z., PERKO, V.M., HABUS, J., MARGALETIC, J., PERNAR, R. & TURK, N. (2014). Acta Tropica Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp . reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Tropica*. 131. p. 111–116.
- MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M.A., CRODA, J., YOUNG, T.A., SIQUEIRA, I., BOLIN, C.A., REIS, M.G., RILEY, L.W., HAAKE, A. & KO, A.I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Biology*. 49(4). p. 929–945.
- MCBRIDE, A.J. A, SANTOS, B.L., QUEIROZ, A., SANTOS, A.C., HARTSKEERL, R. A, REIS, M.G. & KO, A.I. (2007). Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 14(9). p. 1245–8.
- MCBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G. & KO, A.I. (2005). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 18(5). p. 376–386.
- MERIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G. & GIRONS, I. SAINT (1992). *Leptospira* spp . in clinical samples . Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples. *Journal of clinical microbiology*. 30(9).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (1995). *Manual de leptospirose* 2ª ed.
- MONTE, L.G., CONCEIÇÃO, F.R., COUTINHO, M.L., SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., VASCONCELLOS, F. A, DECASTRO, L. A S., HARTLEBEN, C.P., DELLAGOSTIN, O. A & ALEIXO, J. A G. (2011). Monoclonal antibodies against the leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B conserved regions. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 34(5). p. 441–6.
- MONTE, L.G., JORGE, S., XAVIER, M. A, LEAL, F.M. A, AMARAL, M.G., SEIXAS, F.K., DELLAGOSTIN, O. A & HARTLEBEN, C.P. (2013). Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. *Acta tropica*. 126(2). p. 164–166.
- MURRAY, G.L., LO, M., BULACH, D.M., SRIKRAM, A., SEEMANN, T., QUINSEY, N.S., SERMSWAN, R.W., ALLEN, A. & ADLER, B. (2013). Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*. 31(3). p. 495–9.

- NASCIMENTO, A.L.T.O., KO, A.I., MARTINS, E.A.L., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., HO, P.L., HAAKE, D.A., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., HARTSKEERL, R.A., MARQUES, M. V, OLIVEIRA, M.C., MENCK, C.F.M., LEITE, L.C.C., CARRER, H., COUTINHO, L.L., DEGRAVE, W.M., DELLAGOSTIN, O.A., EL-DORRY, H., FERRO, S., FERRO, M.I.T., ET AL. (2004). Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. *Journal of bacteriology*. 186(7). p. 2164–2172.
- NASCIMENTO, A.L.T.O., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., VAN SLUYS, M. A, MONTEIRO-VITORELLO, C.B., CAMARGO, L.E. A, DIGIAMPIETRI, L. A, HARSTKEERL, R. A, HO, P.L., MARQUES, M. V, OLIVEIRA, M.C., SETUBAL, J.C., HAAKE, D. A & MARTINS, E. A L. (2004). Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Brazilian journal of medical and biological research*. 37(4). p. 459–78.
- NATARAJASEENIVASAN, K., PRABHU, N., SELVANAYAKI, K., RAJA, S.S. & RATNAM, S. (2004). Human leptospirosis in Erode, South India: serology, isolation, 51 and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 57. p. 193–197.
- OBREGÓN, A.M., FERNÁNDEZ, C., RODRÍGUEZ, I. & RODRÍGUEZ, J. (2007). The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. *Revista cubana de medicina tropical*. 59(1). p. 68–70.
- PALANIAPPAN, R.U.M. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. 53(10). p. 975–984.
- PEREIRA, M.M., MATSUO, M.G., BAUAB, A R., VASCONCELOS, S. A, MORAES, Z.M., BARANTON, G. & SAINT GIRONS, I. (2000). A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 38(1). p. 450–2.
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULODIS, A.N., DURSKI, K. & HARTSKEERL, R. A (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 78(1). p. 1–8.
- PICARDEAU, M., BULACH, D.M., BOUCHIER, C., ZUERNER, R.L., ZIDANE, N., WILSON, P.J., CRENO, S., KUCZEK, E.S., BOMMEZZADRI, S., DAVIS, J.C., MCGRATH, A., JOHNSON, M.J., BOURSAX-EUDE, C., SEEMANN, T., ROUY, Z., COPPEL, R.L., ROOD, J.I., LAJUS, A., DAVIES, J.K., ET AL. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PloS one*. 3(2). p. E1607.
- PLANK, R. & DEAN, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2(10). p. 1265–76.

- REN, S., FU, G., JIANG, X. & ZENG, R. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422(24). p. 888–893.
- RENAUD, C., ANDREWS, S., DJELOUADJI, Z., LECHEVAL, S., CORRAO-REVOL, N., BUFF, S., DEMONT, P. & KODJO, A. (2013). Prevalence of the *Leptospira* serovars Bratislava, Grippotyphosa, Mozdok and Pomona in French dogs. *The Veterinary Journal*. 196. p. 126–127.
- RICALDI, J.N., FOUTS, D.E., SELENGUT, J.D., HARKINS, D.M., PATRA, K.P., MORENO, A., LEHMANN, J.S., PURUSHE, J., SANKA, R., TORRES, M., WEBSTER, N.J., VINETZ, J.M. & MATTHIAS, M. A (2012). Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS neglected tropical diseases*. 6(10). p. E1853.
- RICALDI, J.N. & VINETZ, J.M. (2006). Leptospirosis in the Tropics and in Travelers. *Current Infectious Diseases Reports*. 8(1). p. 51–58.
- RISSMAN, A.I., MAU, B., BIEHL, B.S., DARLING, A.E., GLASNER, J.D. & PERNA, N.T. (2009). Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 25(16). p. 2071–3.
- ROMERO, E.C., BLANCO, R.M. & GALLOWAY, R.L. (2009). Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Letters in applied microbiology*. 48(5). p. 623–7.
- SALAÜN, L., MÉRIEN, F., GURIANOVA, S., BARANTON, G. & PICARDEAU, M. (2006). Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*. 44(11). p. 3954–62.
- LA SCOLA, B., BUI, L.T.M., BARANTON, G., KHAMIS, A. & RAOULT, D. (2006). Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS microbiology letters*. 263(2). p. 142–7.
- SEIXAS, F.K., FERNANDES, C.H., HARTWIG, D.D., CONCEIÇÃO, F.R., ALEIXO, J.A.G. & DELLAGOSTIN, O.A. (2007). Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Vaccine*. 479. p. 472–479.
- SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., HARTWIG, D.D., CERQUEIRA, G.M., AMARAL, M., FAGUNDES, M.Q., DOSSA, R.G. & DELLAGOSTIN, O.A. (2007). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*. 26(1). p. 88–95.
- SHANG, E.S., SUMMERS, T. A & HAAKE, D. A (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and immunity*. 64(6). p. 2322–30.

- SILVA, É.F., CERQUEIRA, G.M., SEYFFERT, N., SEIXAS, F.K., HARTWIG, D.D., ATHANAZIO, D. A, PINTO, L.S., QUEIROZ, A., KO, A.I., BROD, C.S. & DELLAGOSTIN, O.A. (2009). *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 15(4). p. 4–7.
- SILVA, E.F., FÉLIX, S.R., CERQUEIRA, G.M., FAGUNDES, M.Q., NETO, A.C.P.S., GRASSMANN, A.A., AMARAL, M.G., GALLINA, T. & DELLAGOSTIN, O.A. (2010). Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 83(2). p. 336–7.
- SILVA, E.F., SANTOS, C.S., ATHANAZIO, D. A, SEYFFERT, N., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., FAGUNDES, M.Q., BROD, C.S., REIS, M.G., DELLAGOSTIN, O. A & KO, A.I. (2008). Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 26(31). p. 3892–6.
- SILVA, É.F., SEYFFERT, N., JOUGLARD, S.D.D., ATHANAZIO, D. A., DELLAGOSTIN, O. A. & BROD, C.S. (2009). Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(2). p. 174–176.
- STODDARD, R. A, GEE, J.E., WILKINS, P.P., MCCAUSTLAND, K. & HOFFMASTER, A.R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 64(3). p. 247–55.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12). p. 2725–9.
- TERPSTRA, W.J., LIGTHART, G.S. & SCHOONE, G.J. (1985). ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *Journal of general microbiology*. 131. p. 377–385.
- TSAI, I.J., OTTO, T.D. & BERRIMAN, M. (2010). Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. *Genome biology*. 11(4). p. R41.
- VARNI, V., RUYBAL, P., LAUTHIER, J.J., TOMASINI, N., BRIHUEGA, B., KOVAL, A. & CAIMI, K. (2014). Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 22. p. 216–22.
- VICTORIA, B., AHMED, A., ZUERNER, R.L., AHMED, N., BULACH, D.M., QUINTEIRO, J. & HARTSKEERL, R. A (2008). Conservation of the *S10-spc-alpha* locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PloS one*. 3(7). p. E2752.
- VILLUMSEN, S., PEDERSEN, R., BORRE, M.B., AHRENS, P., JENSEN, J.S. & KROGFELT, K.A. (2012). Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and

blood: pit-falls of in silico validation. *Journal of microbiological methods*. 91(1). p. 184–90.

WHO (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*, Malta.

YAN, W., FAISAL, S.M., McDONOUGH, S.P., DIVERS, T.J., BARR, S.C., CHANG, C.F., PAN, M.-J. & CHANG, Y.-F. (2009). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 11. p. 230–237.

YE, C., YAN, W., McDONOUGH, P.L., McDONOUGH, S.P., MOHAMED, H., DIVERS, T.J., CHANG, Y.-F. & YANG, Z. (2014). Serodiagnosis of equine leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay using four recombinant protein markers. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 21(4). p. 478–83.

ZERBINO, D.R. & BIRNEY, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*. 18(5). p. 821–9.

8 ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Isolamento e caracterização de *Leptospira* spp. de pacientes humanos

Pesquisador Responsável: Odir Antônio Dellagostin **Telefone:** (53) 9988-8392

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente: _____ **No.** _____ **de**
Identificação: _____

Para ser lido a todos os participantes e responsáveis legais dos pacientes menores:

As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. Antes de decidir participar ou dar autorização para o seu filho(a) participar, é importante que você entenda por que a pesquisa está sendo realizada e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler ou ouvir com atenção as informações seguintes e discutir isto com os seus familiares, amigos e seu médico. O entrevistador poderá responder todas as perguntas que você tiver sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Justificativa da Pesquisa: Nós estamos convidando você (ou seu filho (a)) participar de um estudo que está sendo realizado no Laboratório de Vacinologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Universidade Federal de Pelotas sobre *Leptospira* spp., bactérias disseminadas no ambiente através da urina de animais infectados e que podem causar leptospirose. A leptospirose é uma doença sistêmica, na qual o paciente apresenta insuficiência hepática e renal, febre e, em alguns casos e hemorragia pulmonar. Alguns exames são normalmente realizados nos casos de suspeita de leptospirose, que podem dizer se a pessoa está com esta doença e permitir que se conheça quais as bactérias, e suas variantes, que estão circulando na nossa Cidade, contribuindo para o entendimento e controle desta doença. O objetivo deste estudo é isolar e caracterizar essas bactérias para obtenção de informações relevantes ao desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos mais eficientes, de modo que, no futuro, possa-se empregar medidas para diminuir o número de casos de leptospirose. Você (ou seu filho(a)) não sofrerá nenhum desconforto e não haverá nenhum risco para a saúde do mesmo.

Procedimento: Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este formulário de consentimento, uma enfermeira treinada e experiente lhe fará perguntas sobre o local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica de (ou de seu filho(a)). Após a entrevista, ela vai coletar amostra de sangue (aproximadamente 10 mL) utilizando seringa e agulha descartáveis.

Sigilo: Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você, os investigadores do grupo de estudo, o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas terão acesso a estas informações. Você (ou seu (sua) filho(a)) não será identificado em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo. A amostra coletada será numerada e não conterá qualquer nome, para garantir o seu anonimato ou o de seu (sua) filho(a).

Participação voluntária: Sua participação (ou de seu (sua) filho(a)) neste estudo é voluntária, você pode se recusar a participar. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você ache que não são adequadas e não queira responder. Se quiser, você tem o direito de recusar a respondê-las. Além disso, sua participação ou não neste projeto não causará nenhuma diferença ou perda no atendimento de seus problemas de saúde em qualquer local. Você não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de amostras, associada com este estudo. Você não receberá compensação financeira para participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Benefícios: O paciente não terá um benefício direto na participação deste estudo, mas estará contribuindo para a coleta de informações sobre estas bactérias que causam doenças graves em humanos e animais. Estas informações serão utilizadas para auxiliar no desenvolvimento e na adoção de medidas de prevenção como vacinas e testes de diagnóstico.

Riscos: O risco na participação neste estudo é mínimo, sendo que o único inconveniente é a “picada” da agulha no momento da coleta de sangue. A participação no estudo não vai interferir no tratamento da doença.

Outras informações: É provável que amostras bacterianas de *Leptospira* spp. sejam isoladas da sua corrente sanguínea ou da de seu (sua) filho(a). Esses isolados serão caracterizados com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e testes de diagnóstico. Neste caso, as culturas bacterianas podem ser mantidas em laboratório para uso futuro em outros projetos de pesquisa.

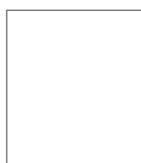
Quem contatar: Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Ana Noronha pelo telefone: (53) 3273-7151. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, Avenida Duque de Caxias, 250, Fragata, Pelotas, telefone: (53) 3221-3554.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu voluntariamente consinto que eu, ou o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou guardião legal, participe do estudo. Declaro ainda que recebi informações de forma clara, detalhada e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, justificativa, riscos, desconfortos e benefícios do estudo, todos acima descritos.

Assinatura do pai, mãe ou responsável legal

Data

Hora



Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

Investigador

Assinatura

Data

Anexo B – *Dispatch* que será submetida à revista *Emerging Infectious Diseases*

All text: Times New Roman 12-pt. font; double-spaced and left aligned (left-justified).

Manuscript Number (if known)

Article Summary Line: This is the first work to report the characterization of *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok from an asymptomatic dog and, four years later, a symptomatic human in the Southern Hemisphere, placing it as a public health concern with epidemiological implications.

Running Title: Characterization of *L. kirschneri* serovar Mozdok

Keywords: Leptospira; leptospirosis; zoonosis

Title Human infection with *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok: first report in the Southern hemisphere

Authors: Carlos Eduardo Pouey da Cunha, Samuel Rodrigues Felix, Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Anelize Campello-Felix, Frederico Schmitt Kremer, Leonardo Garcia Monte, Márcia de Oliveira Nobre, Éverton Fagonde da Silva, Claudia Pinho Hartleben, Alan John Alexander McBride and Odir Antonio Dellagostin.

Affiliation:

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil (C. Cunha, S. Felix, A. Seixas Neto, A. Campello-Felix, L. Monte, M. Nobre, É. Silva, C. Hartleben, A. McBride, O. Dellagostin.)

Abstract - word count

Leptospirosis is a zoonosis caused by different *Leptospira* species. *L. kirschneri* serovar Mozdok has not been implicated in human leptospirosis in the Southern Hemisphere. We report the characterization of two *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok isolated from a dog and a human, placing it as a health concern for humans.

Text – word count (word counts are strictly enforced)

Leptospirosis is a re-emerging zoonotic disease and the latest estimates of the global burden show an upwards trend. The original estimates in 1999 (1) predicted some

500,000 annual cases, compared to the latest prediction of 873,000 cases and 49,000 mortalities per year, a 74.6% increase over 15 years (2). Accurate laboratory diagnosis continues to be a limiting factor, meaning that the true global burden of leptospirosis is likely much higher (3). In Latin America the prevalence of severe leptospirosis is high (10,000 cases a year) due to the tropical climate and lack of appropriate sanitation (3). Although Pelotas has a subtropical climate, more than 50 cases of human leptospirosis per 100,000 inhabitants are reported each year (as of 2001), one of the highest rates in southern Brazil (4). The infection rate for Pelotas is much higher than that of Brazil in the same period (3.5/100,000) and for other regions with similar climate conditions (>10/100,000) (5).

To date, there are ten pathogenic *Leptospira* species, which include more than 260 serovars (6). *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* are most commonly associated with human leptospirosis (7). In Brazil, *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni are the main cause of leptospirosis, the reservoir hosts are rats in urban scenarios of poverty and lack of sanitation, whilst rural cases of leptospirosis are mainly neglected. To the best of our knowledge, *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok has only been implicated in human leptospirosis in Cuba (8). It is endemic to Croatia, where it is prevalent in wild rodents. The occurrence of human leptospirosis caused by serogroup Pomona is common in the region, however, serovar Mozdok has not yet been implicated in any human cases (9). Serovar Mozdok has also been implicated in canine leptospirosis in Europe (10).

We report herein the isolation and characterization of two *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok isolates, recovered from canine and human cases of leptospirosis in the city of Pelotas, southern Brazil. The canine strain was isolated in 2009, during a municipal dog castration/neutering program. Urine samples were aseptically collected from the bladder during the ovarian-hysterectomy surgery, through aspiration with an insulin needle (30G), and syringe. The urine was immediately inoculated into un-supplemented EMJH medium (100 µL of urine in 5 mL of media) for one hour, and then sub-cultured in EMJH containing 10% commercial supplement (DIFCO). The dog from which the strain was isolated was asymptomatic, and was released after surgery. The human isolate was obtained from the blood culture of a 56-year-old female patient from a rural area of the city. The patient

presented with headache, myalgia, fever, vomiting, fatigue, sleepiness, and arthralgia and reported contact with dogs, rats, pigs, cattle, and flood water. The isolate was cultured in EMJH medium, as described for the canine isolate. Both isolates were identified as *L. kirschneri* by *secY* gene sequencing (11). MLST typing (7) further characterized the isolates as *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok (ST 117). All sequencing procedures were performed using paired-end technology on a illumine Solexa plataform. The canine isolate was named 3759, and the human isolate was named 61H.

In order to assess the relatedness of these two strains to those previously isolated in the city of Pelotas, concatenated sequences of the *loci* used for MLST were employed to generate a phylogenetic tree by the Neighbour-joining method. Of note, the strains isolated in this study were grouped in a separate branch of the tree, demonstrating their lack of relatedness to the other isolates.

To determine the pathogenicity of the isolates, Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected with approximately 10^8 leptospiras. Both isolates caused severe leptospirosis and met end-point criteria for euthanasia within four to seven days post-infection. The human isolate LD₅₀ was determined to be 170 cells in the hamster model. Histopathological analysis revealed hemorrhagic kidneys with infiltration of mononuclear cells, diffuse lesions and tubular necrosis; the livers presented diffuse degeneration and atypical hepatocyte architecture; the lungs presented edema, congestion, hemorrhage, emphysema, fibrin in the alveoli and hemosiderin within 7 days of infection. The imprint technique (12) confirmed the presence of leptospiras in the kidneys, liver and lungs of animals. The presence of virulence factors LigA, LigB as well as LipL32 (13) were confirmed by indirect immunofluorescence using rabbit polyclonal sera against each specific antigen. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Pelotas (Permit number 6843).

Although serovar Mozdok has been implicated in canine leptospirosis, mainly in Europe (10), to our knowledge this is the first report of isolation. Likewise, it is the first isolate obtained from a human patient in the southern hemisphere, and only the second worldwide (8). The isolation of serovar Mozdok from a dog, and then four years later from a patient with leptospirosis, suggests that the serovar has adapted to

at least one reservoir host and is circulating in the city, with the potential to cause infection. Furthermore, asymptomatic dogs carrying virulent leptospiras are of particular public health concern, especially in a city with over 20,000 stray animals and previous studies have associated them with an increased risk for leptospirosis (14).

The most effective way to achieve protection against leptospirosis is through vaccination. However, current vaccines are heat-killed whole-cell *Leptospira* spp. that provide only serovar-specific protection and are licensed in only a few countries, as previously reviewed (13). Furthermore, while these vaccines could be effective in urban scenarios such as Salvador and São Paulo, where one serovar is responsible for most human and animal cases (3), in mixed urban/rural scenarios such as Pelotas, where leptospirosis is caused by various serovars (15), novel vaccines capable of inducing a cross-protective response are a necessity. Therefore, characterization of clinical isolates to the serovar level is of crucial importance, not only to understand the epizootiology of the disease, but also for development of novel vaccines. This study highlights the possibility that previously unreported serovars may be introduced into urban and rural settings with no apparent epidemiological cues.

We believe this to be the first report of *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok isolated in the southern hemisphere, making it one of the prevalent species causing disease in humans and animals in southern Brazil, and possibly in other parts of the world with similar environmental condition. Furthermore, the epidemiological data presented here will be important for the development of both animal and human leptospirosis vaccines and/or rapid diagnosis tests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ana Iara Noronha and Marta Gonçalves Amaral for their contribution to this study. The authors also thank CNPq and CAPES for funding and scholarships. Funders had no role on publication. The authors declare no conflict of interest.

Disclaimers

A disclaimer is not generally needed because EID journal publishes a CDC disclaimer.

Author Bio (first author only, unless there are only 2 authors)

C. Cunha is a PhD student at Universidade Federal de Pelotas. His research interests are molecular biology and engineering, bacteriology and immunology.

References

1. WHO. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec.* 1999;74:237–42.
2. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier Inc.; 2014 Jan;78(1):1–8.
3. McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2005 Oct;18(5):376–86.
4. Barcellos C, Lammerhirt CB, Almeida MA, Santos E. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. *Cad Saúde Pública.* 2003;19:1283–92.
5. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta; 2003.
6. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Sep 23;33(1).
7. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG, et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jan;7(1):e1954.
8. Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59(1):68–70.
9. Majetic ZS, Galloway R, Sabljic ER, Milas Z, Perko VM, Habus J, et al. Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp . reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 2014;131:111–6.

10. Renaud C, Andrews S, Djelouadji Z, Lecheval S, Corrao-revol N, Buff S, et al. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava , grippityphosa , mozdok and pomona in French dogs. Vet J. 2013;196:126–7.
11. Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, et al. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. PLoS One. 2008 Jan;3(7):e2752.
12. Chagas-Junior AD, McBride AJA, Athanzio DA, Figueira CP, Medeiros MA, Reis MG, et al. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. J Med Microbiol. 2009 Dec;58(Pt 12):1632–7.
13. Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Félix SR, da Silva ÉF, McBride AJA. Recombinant vaccines against leptospirosis. Hum Vaccin. 2011 Nov;7(11):1215–24.
14. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Jan;2(4):e228.
15. Silva ÉF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanzio DA, et al. *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):4–7.

Address for correspondence: Odir Antonio Dellagostin, Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354, 96010-90, Pelotas, RS, Brazil; email: odir@ufpel.edu.br

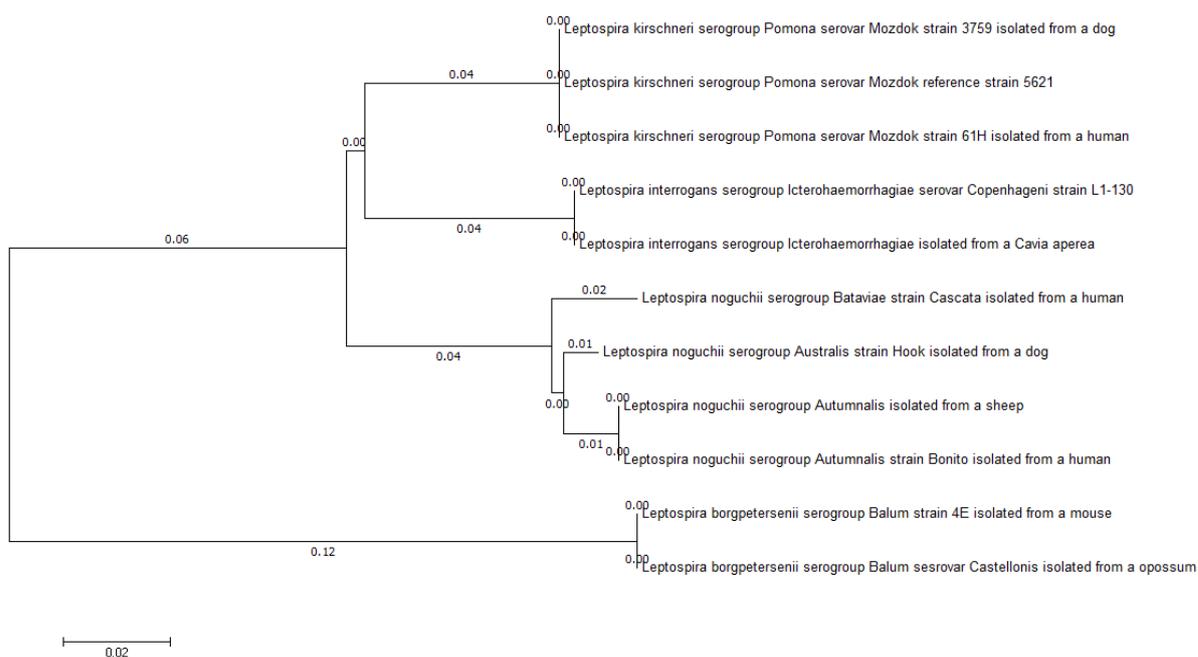


Figure 1. Dendrogram constructed based on the concatenated sequences of the seven loci used by the MLST technique. Human and animal isolates from Pelotas are represented, as well as two reference strains (L1-130 and 5621). Branch lengths are displayed next to each branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. Sequences used to construct this dendrogram are available at <http://leptospira.mlst.net/portable/portable.xls> and be concatenated at the same site.