

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE BIOFILME E
FORMA PLANCTÔNICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* OBTIDOS
DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

RODRIGO REZENDE MIRES DE CARVALHO

Salvador-BA

2022

RODRIGO REZENDE MIRES DE CARVALHO

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE BIOFILME E
FORMA PLANCTÔNICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* OBTIDOS
DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Melissa Hanzen Pinna Valentim

**Salvador - BA
2022**

Carvalho, Rodrigo Rezende Mires de.

Susceptibilidade antimicrobiana in vitro de biofilme e forma planctônica de *Leptospira interrogans* obtidos de cães naturalmente infectados / Rodrigo Rezende Mires de Carvalho. - 2022.

76 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Medicina veterinária. 2. Microbiologia veterinária. 3. Saúde pública veterinária. 4. Leptospirose em animais. 5. *Leptospira*. I. Valentim, Melissa Hanzen Pinna. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.089

CDU - 636.09

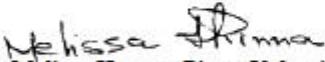
**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE BIOFILME E
FORMA PLANCTÔNICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* OBTIDOS DE
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

RODRIGO REZENDE MIRES DE CARVALHO

**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal nos Trópicos**

Salvador, 28 de março de 2022

Comissão examinadora:


Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim
Presidente da banca
PPGCAT-UFBA

Dra. Camila Hamond Regua Motta Reis
NVSL-USDA

Dra. Maria Cristina Ríos Álvarez
Universidad de la Republica Uruguay

Dr. Ricardo Wagner Dias Portela
PPGCAT-UFBA

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Januário e irmã Ingrid, pela educação e incentivo aos estudos. Minhas fontes de amor e admiração.

À profa. Melissa Hanzen Pinna pelo incentivo, por ter acreditado e confiado em mim ao longo desses anos. Sempre lembrarei da senhora com admiração eterna, por ser uma referência como ser humano e profissional.

À Dra. Camila Hamond pelos ensinamentos, paciência e auxílio na realização do trabalho. Sem a sua maestria, experiência e solicitude na transmissão de conhecimento, eu não teria conseguido. Muito obrigado.

Ao prof. Ricardo Portela, pelo incentivo, disponibilidade e auxílio com as análises. Ter sido o seu aluno na Pós-Graduação foi uma experiência enriquecedora.

À minha companheira de vida, Thainá Melo que me auxiliou nos experimentos, sem você ao meu lado sempre me apoiando, eu não teria conseguido.

À equipe da plataforma de microscopia da Fiocruz-BA pelo apoio com estrutura e equipamentos para a realização de parte do trabalho, em especial ao Dr. Cláudio Pereira e Dra. Karine Damasceno.

À toda equipe do Laboratório de Bacterioses (LABAC), pela convivência, incentivo e experiência enriquecedora ao longo dos últimos anos. Agradeço especialmente a Marta Bittencourt e Marinalva Gonsaga, pela amizade, carinho e atenção. Aos colegas Carla Dias e Lucas Paz, pela experiência, parceria e amizade durante todo esse tempo. Vocês tornavam nossos dias mais leves. Muito obrigado pela amizade.

À fonte de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, por toda experiência acadêmica e profissional.

RESUMO

CARVALHO, R. R. M. **Susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de biofilme e forma planctônica de *Leptospira interrogans*, obtidos de cães naturalmente infectados.** 2022. 76p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, 2022.

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, com grande impacto na saúde pública. *Leptospira* spp. são hábeis na produção de biofilme, contudo apesar de sua importância, ainda são escassos os estudos envolvendo isolamento de cepas autóctones, com posterior avaliação da sensibilidade antimicrobiana, nas formas planctônica e biofilme. Neste estudo, objetivou-se avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de uma cepa de referência (*L. interrogans*, sv. Copenhageni L1 130 - L20) e cepas de *L. interrogans* (C20, C29, C51, C82) recentemente isoladas, com posterior avaliação da susceptibilidade antimicrobiana nas formas planctônica e biofilme. A formação de biofilme *in vitro* foi testada em incubação a 30°C, sob condições estáticas, com subsequente observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A semiquantificação da produção de biofilme foi realizada por espectrofotometria, em placas de poliestireno, com a utilização do cristal violeta, em diferentes pontos observacionais (1, 7, 14 e 21 dias de incubação). Todas as cepas foram eficientes na formação de biofilme *in vitro* até o 21º dia de observação. A semiquantificação permitiu observar que tanto a cepa L1 130 como as cepas recentemente isoladas (C20, C29, C51 e C82) apresentaram valores semelhantes de densidade óptica (DO) até o 3º dia de incubação. No 5º dia foi possível observar variação nas DOs com mínima de 0,176 (C20) e máxima de 0,236 (C51). Aumento na biomassa de biofilmes foi observado a partir do 7º dia, com DOs máximas no 21º dia (L1 130 DO = 0,441±0,02, C20 DO = 0,437±0,02, C29 DO = 0,309±0,01, C51 DO = 0,503±0,02, C82 DO = 0,353±0,02). Na visualização por MEV, no sétimo dia de incubação, foi possível observar a formação de biofilme maduro para todas as cepas. Nos dias 14 e 21, os biofilmes apresentaram-se como estruturas morfologicamente mais desenvolvidas e coesas, mantendo as características de um biofilme maduro, entretanto com maior deposição de matriz extracelular. No 21º dia, as imagens demonstraram a presença de diversos canais interconectados e filamentos ramificados de matriz extracelular formados em vários pontos nos biofilmes. Quatro antimicrobianos (amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e ciprofloxacina) foram empregados nos testes de susceptibilidade antimicrobiana, com concentrações finais variando de 0,02µg/mL a 1,600µg/mL. Na forma planctônica, as cepas demonstraram sensibilidade à todas as drogas com CIM₉₀ de ≤0,02 µg/mL para amoxicilina e ampicilina, 0,2 µg/mL para doxiciclina e 0,1 µg/mL para ciprofloxacina. Os biofilmes destas cepas foram mais resistentes quando comparados às suas formas planctônicas, com CIM₉₀ de 1,600 µg/mL para amoxicilina, 800 µg/mL para ampicilina e >1,600 µg/mL para doxiciclina e ciprofloxacina. Dentro do intervalo de concentrações antimicrobianas, as cepas na forma de biofilme foram 13 a 16 vezes mais resistentes do que as formas planctônicas. Alguns isolados apresentaram CIMs superiores à diluição máxima utilizada neste estudo (1.600ug/ml). As cepas deste estudo foram obtidas a partir de amostras de cães naturalmente infectados e estes atuam como reservatórios e sentinelas para a infecção em humanos. O isolamento de cepas formadoras de biofilme, com potencial perfil de resistência antimicrobiana, demonstra informações importantes para investigações genômicas que visem elucidar os mecanismos moleculares responsáveis por tais características. Estas abordagens permitirão o desenvolvimento de estratégias de tratamento e controle refinadas voltadas para a realidade epidemiológica da doença.

Palavras-chave: Leptospirose, microdiluição em caldo, resistência antimicrobiana

ABSTRACT

CARVALHO, R. R. M. ***In vitro* antimicrobial susceptibility of biofilm and planktonic form of *Leptospira interrogans*, obtained from naturally infected dogs.** 2022. 76p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, 2022.

Leptospirosis is a zoonosis caused by spirochetes from the genus *Leptospira*, considered to have great impact on public health. *Leptospira* spp. are able to form biofilms, however, despite their importance, there are still few studies involving isolation of autochthonous strains, with subsequent evaluation of antimicrobial sensitivity in planktonic and biofilm forms. The objective of this study was to evaluate the capacity of *in vitro* biofilm formation from a reference strain (*L. interrogans*, sv. Copenhageni L1 130 - L20) and from recently isolated strains of *L. interrogans* (C20, C29, C51, C82), with subsequent evaluation of antimicrobial susceptibility in planktonic and biofilm forms. *In vitro* biofilm production was tested with incubation at 30°C, under static conditions, and subsequent observation in scanning electron microscopy (SEM). The semi quantification of biofilm production was performed by spectrophotometry in polystyrene plates at different observational points (1, 7, 14 and 21 days). All strains were efficient for *in vitro* biofilm formation up until the 21st day of observation. Semi quantification revealed that both L1 130 and the recently isolated strains (C20, C29, C51 and C82) presented similar optical density (OD) values until the 3rd day of incubation. On the 5th day ODs varied from a minimum of 0.176 (C20) to a maximum of 0.236 (C51). Increase in biofilm biomass was observed from the 7th day onward, with maximum optical densities on the 21st day (L1 130 OD = 0.441±0.02, C20 OD = 0.437±0.02, C29 OD = 0.309±0.01, C51 OD = 0.503±0.02, C82 OD = 0.353±0.02). Through SEM visualization, it was possible to observe formation of mature biofilm for all strains on the 7th day of incubation. On days 14 and 21, the biofilms presented themselves as morphologically more developed and cohesive structures, maintaining the characteristics of a mature biofilm, but with greater deposition of extracellular matrix. On the 21st day, the images demonstrated the presence of several interconnected channels and branched filaments of extracellular matrix formed at various points. Four antimicrobials (amoxicillin, ampicillin, doxycycline, and ciprofloxacin) were used in the antimicrobial susceptibility tests, with final concentrations ranging from 0.02µg/mL to 1,600µg/mL. In the planktonic form, the strains showed sensitivity to all drugs with MIC₉₀ of ≤0.02 µg/mL for amoxicillin and ampicillin, 0.2 µg/mL for doxycycline, and 0.1 µg/mL for ciprofloxacin. These strains on biofilm were considerably more resistant compared to their planktonic form, with MIC₉₀ of 1,600 µg/mL for amoxicillin, 800 µg/mL for ampicillin, and >1,600 µg/mL for doxycycline and ciprofloxacin. Within the range of antimicrobial concentrations, the strains in the biofilm form were 13 to 16 times more resistant than the planktonic forms. Some isolates showed MICs higher than the maximum dilution used in this study (1,600µg/ml). The strains in this study were obtained from samples of naturally infected dogs, who might act as reservoirs and sentinels for infection in humans. The isolation of biofilm-forming strains, with a potential antimicrobial resistance profile, demonstrates important information for genomic investigations that aim to elucidate the molecular mechanisms responsible for such characteristics. These approaches will allow the development of refined treatment and control strategies focused on the epidemiological reality of the disease.

Keywords: Leptospirosis., broth microdilution, antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano.....	35
Figura 2	Resistência de biofilme à adição de antibiótico.....	37
Figura 3	Representação gráfica da curva de crescimento de <i>L. interrogans</i> , Sv. Copenhageni (cepa L1 130) e quatro cepas de <i>Leptospira interrogans</i> , sg. Icterohaemorrhagiae (C20, C29, C51 e C82).....	48
Figura 4	Semiquantificação de biofilme <i>in vitro</i> de <i>Leptospira interrogans</i> avaliados por espectrofotometria.....	50
Figura 5	Coloração de biofilme de <i>Leptospira interrogans</i> por cristal violeta, aderido ao fundo dos poços em placas de microtitulação.....	50
Figura 6	Imagens de MEV demonstrando biofilme de cepa C20 em diferentes tempos de incubação.....	51
Figura 7	Imagens de MEV demonstrando biofilmes de <i>Leptospira interrogans</i> (cepas L1 130 e C29) em diferentes tempos de incubação.....	52
Figura 8	Imagens de MEV demonstrando biofilmes de <i>Leptospira interrogans</i> (cepas C51 e C82) em diferentes tempos de incubação.....	53
Figura 9	Imagens de MEV demonstrando a organização e arquitetura de biofilme de <i>Leptospira interrogans</i> (cepa C51) com 21 dias de incubação.....	54
Figura10	Imagens de MEV demonstrando a organização e arquitetura de biofilme de <i>Leptospira interrogans</i> (cepa C82) com 21 dias de incubação.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Formação de biofilme de <i>Leptospira interrogans in vitro</i> sobre condições estáticas em microplacas.....	49
Tabela 2 Semiquantificação de biofilme de <i>Leptospira interrogans in vitro</i> avaliados por espectrofotometria.....	50
Tabela 3 Distribuição de CIMs para amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e ciprofloxacina entre cepa de referência e cepas autóctones de <i>Leptospira interrogans</i> , na forma planctônica e biofilme.....	56

LISTA DE SIGLAS

AB	Alamar Blue
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAAT	Teste de Aglutinação Microscópica com Absorção Cruzada
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EPS	Exopolissacarídeo
FA	Fosfatase alcalina
LigA	<i>Leptospiral Immunoglobulin</i>
LigB	<i>Leptospiral Immunoglobulin-like B</i>
LipL	Lipoproteína de membrana
Loa	Lipoproteína de membrana
LPS	Lipopolissacarídeos
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCT	Proteína de choque térmico
PFA	Paraformaldeído
RNA	Ácido Ribonucléico
SPHL	Síndrome Pulmonar Hemorrágica da Leptospirose

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS EPÉCÍFICOS.....	15
3 HIPÓTESE.....	15
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4.1 AGENTE ETIOLÓGICO E CLASSIFICAÇÃO.....	16
4.2 MORFOLOGIA E CULTIVO.....	17
4.3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
4.4 PATOGENIA.....	20
4.5 SINAIS CLÍNICOS.....	22
4.6 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	24
4.6.1 Métodos diretos.....	24
4.6.2 Métodos indiretos.....	25
4.7 TRATAMENTO.....	26
4.8 TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO.....	30
4.9 BIOFILME- SAÚDE HUMANA, ANIMAL E AMBIENTE.....	32
4.10 BIOFILME NA LEPTOSPIROSE.....	33
4.10.1 Composição da matriz de biofilmes.....	37
4.11 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA LEPTOSPIROSE.....	39
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1 SELEÇÃO DE CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	41
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO.....	42
5.3 DETERMINAÇÃO DO INÓCULO INICIAL PARA OS EXPERIMENTOS.....	43
5.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	43
5.5 SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME CORADO POR CRISTAL VIOLETA.....	43

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	44
5.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMA PLANCTÔNICA.....	44
5.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBINA DE BIOFILME....	45
5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 CURVA DE CRESCIMENTO.....	47
6.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	49
6.3 SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME.....	49
6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	51
6.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMA PLANCTÔNICA E BIOFILME.....	55
7 DISCUSSÃO	57
8 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa de caráter zoonótico e ocorrência mundial com significativo impacto na saúde pública (ADLER; DE LA PENÃ MOCTEZUMA, 2010; COSTA et al., 2015). Causada por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, acomete diversos hospedeiros mamíferos, abrangendo humanos, animais domésticos, sinantrópicos e selvagens, os quais podem ser potenciais fontes de infecção (PETRAKOVSKY et al., 2014). A doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais com elevado índice pluviométrico e condições ambientais que proporcionam ambientes favoráveis à sobrevivência e transmissão de *Leptospira*, sendo mais disseminada em épocas de chuva e áreas sujeitas a alagamentos (COSTA et al., 2015).

Nos cães, a doença pode apresentar gravidade variável, dependendo da virulência e da concentração da cepa infectante, resposta imunológica e adaptabilidade ao hospedeiro (SCHULLER et al., 2015). Os sinais clínicos podem se apresentar desde brandos ou ausentes, até formas graves que levam ao acometimento de múltiplos órgãos (MIOTTO et al., 2016). O estudo sobre as cepas bacterianas e suas interações com a população canina demonstra o reconhecimento da leptospirose como um risco para a saúde pública devido ao estreito convívio estabelecido entre o ser humano e esses animais e a possibilidade de eliminação intermitente das bactérias na urina por longos períodos durante o curso crônico da doença (BLAZIUS et al., 2005; LAVINSKY et al., 2012; SYKES et al., 2011).

Grande parte da atividade bacteriana no ambiente e nos hospedeiros não ocorre somente com as células individualizadas na forma planctônica, mas também com os microrganismos agrupados e organizados em biofilmes (LIU et al., 2016). Biofilmes consistem de um grupo de células bacterianas organizadas em diferentes graus de complexidade, aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e envolvidas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS) (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essas interações conferem propriedades relevantes às bactérias, incluindo maior proteção e resistência a antimicrobianos, toxinas, radiação ultravioleta, salinidade, desidratação, oxidação, estresses ambientais e respostas imunológicas dos hospedeiros (LIU et al., 2016).

Ristow e colaboradores (2008) descreveram a formação de biofilmes *in vitro* em leptospiros patogênicas e saprofíticas. Estudos posteriores sugeriram que a colonização persistente em túbulos contorcidos proximais de rins em espécies hospedeiras de manutenção ocorria em consequência da formação de agregados (ATHANAZIO et al., 2008; SANTOS et al., 2015). Mais recentemente, a formação de biofilme por *Leptospira* em rins de reservatórios

animais (ratos) foi confirmada por Santos e colaboradores (2021). Segundo Thibeaux e colaboradores (2020), os biofilmes de leptospiras podem desempenhar papel fundamental não somente na manutenção da infecção como na resistência antimicrobiana. Destaca-se, que comunidades bacterianas estão envolvidas na patogênese de diversas doenças infecciosas e estudos relatam que bactérias envolvidas em infecções com a presença de biofilme são de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos (CERI; OLSON; TURNER, 2010; OLSON et al., 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos representa relevante problema de saúde pública em nível mundial (LOUREIRO et al., 2016). O potencial para resistência antimicrobiana em leptospiras patogênicas ainda representa uma área pouco explorada (MAURO; HARKIN, 2019). Desta forma, o isolamento de cepas autóctones porta-se como abordagem crucial para identificação de sorogrupos e serovares mais frequentes em cada região. Pesquisas que avaliem o potencial para formação de biofilme e resistência antimicrobiana das respectivas cepas, também são fundamentais para o entendimento epidemiológico da doença e estabelecimento de medidas de profilaxia e controle adequadas ao cenário local.

Objetivou-se no presente estudo avaliar a habilidade de uma cepa de referência e cepas recentemente isoladas de *Leptospira interrogans* formarem biofilme *in vitro*, bem como a susceptibilidade antimicrobiana na forma planctônica e biofilme. Estes dados auxiliarão tanto na identificação de cepas resistentes e com potencial para formação de biofilme, como também na seleção de agentes antimicrobianos para posterior avaliação de modelos terapêuticos, incluindo tratamentos de animais e humanos e/ou ensaios de profilaxia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, nas formas planctônica e biofilme, de cepa de referência e cepas recentemente isoladas de *Leptospira interrogans* obtidas a partir de amostras de cães naturalmente infectados, frente aos principais antimicrobianos utilizados em rotina clínica veterinária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Avaliar a formação de biofilme *in vitro* de cepa de referência e cepas isoladas de *Leptospira interrogans*;
- 2 – Caracterizar a formação *in vitro* de biofilme, por meio da semiquantificação em espectrofotometria;
- 3 – Avaliar a formação, organização e arquitetura de biofilme em diferentes pontos observacionais (1, 7, 14 e 21 dias) através da microscopia eletrônica de varredura;
- 4 – Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas estudadas, na forma planctônica e biofilme.

3 HIPÓTESE

Cepas de *Leptospira interrogans*, obtidas a partir de infecção natural em cães com quadro clínico agudo formam biofilme *in vitro* e apresentam maior resistência a antimicrobianos quando comparadas às suas formas planctônicas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 AGENTE ETIOLÓGICO E CLASSIFICAÇÃO

Leptospiras são bactérias aeróbicas estritas, altamente móveis, pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. O isolamento de Leptospiras foi relatado pela primeira vez a partir de água doce em 1914 por Wolbach e Binger, os quais nomearam o organismo como *Spirocheta biflexa* (WOLBACH; BINGER, 1914). Estas bactérias caracterizam-se por pertencer a um grupo extremamente ramificado com morfologia e fisiologia semelhantes, apesar de suas constituições fenotípicas e genotípicas distintas (LEVETT, 2015).

Até 1989, o gênero *Leptospira* era classificado em duas espécies sorológicas: *Leptospira interrogans sensu lato* (constituindo mais de 250 serovares patogênicos) e *Leptospira biflexa sensu lato* (constituindo mais de 60 serovares de leptospiras saprofitas isoladas a partir do ambiente). As leptospiras eram classificadas de acordo com seus determinantes antigênicos, de forma sorológica (fenotípica) por meio de um teste denominado aglutinação microscópica com absorção cruzada (Cross-Aglutinin Absorption Test - CAAT), baseado no polimorfismo dos carboidratos que compõem os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular externa (BHARTI et al., 2003). A aglutinação sorológica com antígenos homólogos por meio do CAAT permitiu identificar mais de 300 sorovares de *Leptospira* e os sorovares relacionados antigenicamente foram agrupados em 25 sorogrupos (OIE, 2018; PICARDEAU, 2020).

A classificação sorológica com designações de serovar e sorogrupo ainda mantém a sua importância com contribuições em estudos epidemiológicos e na rotina clínica. Porém, com o avanço das técnicas moleculares, a classificação sorológica tem sido substituída pelo sequenciamento de genoma completo (PICARDEAU, 2020), que agrupa as leptospiras em diferentes espécies genômicas com DNA relacionado (SCHULLER et al., 2015). É importante salientar que não há correlação entre a classificação sorológica (define os sorogrupos) e genômica (define as genomoespécies), visto que serovares distintos podem pertencer a mais de uma espécie ao mesmo tempo (LEVETT, 2015).

Vicent e colaboradores (2019) sugeriram uma nova subdivisão em quatro subclados: P1 como patogênicas, P2 como intermediárias, S1 como saprófitas e S2 como novo subclado, reforçando a existência de uma grande diversidade no gênero *Leptospira* (VICENT et al., 2019). Mais recentemente quatro novas espécies de *Leptospira* foram descobertas, representando duas novas espécies do subclado patogênico - P1, e outras duas novas espécies saprofitas do

subclado S1 (KORBA et al., 2021). Desta forma, até o momento são descritas 68 espécies, onde 19 são classificadas como patogênicas (P1): *L. mayottensis*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. alstonii*, *L. adleri*, *L. barantonii*, *L. ellisii*, *L. dzianensis*, *L. gomenensis*, *L. putramalaysiae*, *L. tipperaryensis*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. ainlahdjerensis*, *L. ainazelensis*; 21 como intermediárias (P2): *L. broonii*, *L. licerasiae*, *L. fainei*, *L. venezuelensis*, *L. wolffii*, *L. haakeii*, *L. hartskeerlii*, *L. saintgironisae*, *L. neocaledonica*, *L. perolatii*, *L. dzoumogneensis*, *L. fletcheri*, *L. fluminis*, *L. johnsonii*, *L. koniamboensis*, *L. langatensis*, *L. sarikeiensis*, *L. selangorensis*, *L. semungkisensis*, *L. andrefontaineae*, *L. inadai*; 23 como saprófitas (S1): *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. yanagawae*, *L. brenneri*, *L. harrisiae*, *L. levettii*, *L. kemamanensis*, *L. bandrabouensis*, *L. bourretii*, *L. bouyouniensis*, *L. congkakensis*, *L. ellinghausenii*, *L. jelokensis*, *L. kanakyensis*, *L. montravelensis*, *L. mtsangambouensis*, *L. noumeaensis*, *L. perdikensis*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*; *L. abararensis*, *L. chreensis* e 5 como novo subclado (S2): *L. idonii*, *L. ilyithenensis*, *L. kobayashii*, *L. ognonensis*, *L. ryugenii* (BOURHY et al., 2014; PUCHE et al., 2018; THIBEAUX et al., 2018; VICENT et al., 2019; KORBA et al., 2021).

4.2 MORFOLOGIA E CULTIVO

Leptospira (do grego leptós, fino, pequeno, delicado e speira, spira) são bactérias helicoidais de 6 a 12 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro, com um ou ambos os terminais em forma de gancho (CAMERON, 2015; PICARDEAU, 2020). Apresentam flagelos periplasmáticos em cada pólo celular, ancorados à aproximadamente 0,18 nm das extremidades, que conferem a exibição de duas formas de movimento, de rotação ao longo do seu eixo sem sobreposição, e de translação, movendo-se rapidamente em linha reta ou em arcos (CAMERON, 2015). Devido a sua morfologia delgada e rápida motilidade, a microscopia de campo claro não é a melhor opção para visualização, tornando necessária a utilização de outras técnicas, como microscopia de campo escuro ou microscopia de campo claro de contraste de fase (CAMERON, 2015; DELLAGOSTIN et al., 2017; RISTOW; LILENBAUM, 2010), imunohistoquímica e imunofluorescência (MAROTTO et al., 2010; NALLY et al., 2004).

A membrana celular caracteriza-se por ser dupla e, embora possuam estrutura semelhante à de bactérias Gram-negativas, como a presença de membrana externa contendo LPS, têm características singulares de parede, como a presença de peptidoglicano ligado à membrana citoplasmática (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Adicionalmente, existem outras estruturas que constituem a membrana externa, com particular atenção às lipoproteínas. LipL32

caracteriza-se por ser uma lipoproteína observada somente em espécies patogênicas, de caráter subsuperficial e localizada no folheto periplasmático da membrana externa (PINNE; HAAKE, 2013). Outras proteínas de relevância na patogênese também se destacam, como LipL41, LipL45, LipL48, LigA, LigB, Loa22 (CHOY et al., 2007; KING et al., 2013; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007). Segundo Murray (2013) e Picardeau (2017), algumas dessas proteínas desempenham papel importante na evasão do sistema imune e patogênese da leptospirose, auxiliando na ligação a várias células distintas, incluindo fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, bem como componentes da matrix extracelular.

Quanto ao cultivo, consideram-se *Leptospira* spp. como bactérias fastidiosas, necessitando de condições especiais para seu crescimento *in vitro*. Apresentam um ótimo crescimento entre 28 ° e 30 °C, com pH ideal encontrando-se entre 6,8 e 7,4 (BHARTI et al., 2003; CAMERON, 2015). São sensíveis a desinfetantes, ressecamento, extremos de temperatura e pH (FAINE, 1999; VINOD KUMAR et al., 2015). Outro fator limitante no cultivo de *Leptospira* é o crescimento de contaminantes e, como medida resolutiva, alguns antibióticos podem ser utilizados, tais como sulfametoxazol, trimetoprim, 5-fluorouracil, gentamicina, anfotericina B e fosfomicina (CHAKRABORTY et al., 2011).

Os principais requisitos nutricionais para o crescimento de *Leptospira* são fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e suplementos nutricionais selecionados. Os ácidos graxos de cadeias longas ou curtas, saturados ou insaturados, representam uma essencial fonte de carbono para o crescimento de *L. biflexa*. Em contrapartida, o crescimento de *L. interrogans* carece de ácidos graxos de cadeias longas e insaturados. Ressalta-se que, quando em concentrações elevadas, esses ácidos podem ser tóxicos, tornando-se necessárias medidas corretivas como a adição de albumina bovina (detoxificante), que sequestra ácidos graxos em excesso no meio, liberando o restante em concentrações não tóxicas. Outra alternativa pode ser a adição de ácidos graxos complexos (Tweens) que não são tóxicos (CAMERON, 2015). Suplementos nutricionais incluem cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês, glicerol, tiamina, biotina, fosfato e sulfato (CAMERON, 2015; FAINE, 1999). Historicamente, a vitamina B12 é definida como nutriente essencial, porém Kurilung e colaboradores (2019) observaram que leptospiros patogênicas são capazes de sintetizá-la.

O tempo de geração neste gênero é variável e depende de fatores como espécie, fase de crescimento, concentração do inóculo, meio de cultura utilizado e adaptabilidade das cepas ao manuseio em culturas *in vitro* (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE, 1999). Leptospiros patogênicas adaptadas a sucessivas passagens *in vitro* apresentam um tempo de geração que varia entre seis e oito horas. Já as espécies patogênicas recém-isoladas apresentam

crescimento fastidioso e necessitam de repetidas passagens, com um tempo de geração um pouco maior, entre 14 e 18 horas. Em contraposição, o crescimento *in vitro* de leptospiras saprófitas é mais rápido, com um tempo de geração estimado em quatro horas e meia (CAMERON, 2015).

4.3 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma doença infecciosa de grande impacto na saúde pública e ocorrência mundial (COSTA et al., 2015). Ocorre em diferentes contextos epidemiológicos (rural, urbano e silvestre), exercendo sua maior carga sobre populações mais carentes e residentes em locais sem infraestrutura adequada (LAU et al., 2010; PICARDEAU, 2015). Os picos de incidência ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais com elevado índice pluviométrico e meio ambiente que proporcionam condições favoráveis à sobrevivência e transmissão de leptospiras (COSTA et al., 2015).

Caracterizada por acometer uma ampla gama de hospedeiros, o controle da doença se torna complexo, uma vez que os portadores crônicos contaminam o ambiente através da eliminação de leptospiras viáveis na urina (BHARTI et al., 2003, LILENBAUM et al., 2008; MWACHUI et al., 2015). O status de carreador crônico já foi relatado em muitas espécies de animais selvagens e domésticos, enfatizando a elevada capacidade infectiva de *Leptospira* spp. em diversos hospedeiros (STRAUB et al., 2020; PINNA et al., 2018, MIOTTO et al., 2018).

A literatura reporta a adaptabilidade de alguns serovares a determinados hospedeiros. Os animais podem ser infectados por diferentes serovares, apresentando quadros infecciosos clínicos agudos e fatais, ou desenvolver formas crônicas acompanhadas de sinais clínicos brandos ou ausentes, que os caracterizam como hospedeiros de manutenção (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009). Dentre os animais domésticos que atuam como peças importantes na manutenção da enfermidade, destacam-se os cães para o serovar Canicola, equinos para Bratislava, ruminantes para Hardjo e suínos para Pomona, Tarassovi e Bratislava (ANDRÉ-FONTAINE, 2006; ADLER, 2015). Os animais sinantrópicos, a exemplo do *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato-castanho), atuam como hospedeiros do serovar Icterohaemorrhagiae e são os principais reservatórios da *Leptospira* spp. nos centros urbanos. Outras espécies de roedores, como o *Rattus rattus* e o *Mus musculus*, também foram relatados como reservatórios (FAINE, 1999).

A atuação dos cães na epidemiologia da leptospirose é complexa, uma vez que estes participam tanto do ciclo urbano quanto do ciclo rural (FONZAR; LANGONI, 2012). Cães

errantes, que conservam hábitos de caça e que tem acesso à rua, tendem a ter um maior contato com o microrganismo, o que permite concluir que esses animais podem se comportar como sentinelas, já que as infecções humanas são precedidas por infecções em cães (SCHULLER et al., 2015). Outro importante fator, é que estes podem albergar um serovar adaptado e desenvolver sinais clínicos brandos ou ausentes, adquirindo o comportamento de hospedeiros cronicamente infectados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; MIOTTO et al., 2016).

Esse comportamento caracteriza os animais como excretores de leptospiros viáveis na urina por longos períodos e de forma intermitente, participando ativamente na epidemiologia da doença e disseminação do agente (BLAZIUS et al., 2005; LAVINSKY et al., 2012). A identificação desses cães é fundamental e deve conter como base uma abordagem multidisciplinar que culmine em um diagnóstico precoce, para que as medidas de tratamento, controle e profilaxia possam ser instituídas (MIOTTO, et al., 2016).

4.4 PATOGENIA

A leptospirose é uma doença multissistêmica, onde mecanismos de interação entre o hospedeiro e a bactéria podem ser os responsáveis por determinar o curso da doença (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Apesar dos avanços tecnológicos na genética, estes mecanismos ainda não são completamente conhecidos na leptospirose, quando comparada a outras doenças bacterianas (MURRAY, 2015; SCHULLER et al., 2015). Os princípios propostos para a patogênese em animais são diversos e incluem a concentração, virulência e adaptabilidade inerente do microrganismo, resposta imune do hospedeiro e migração bacteriana pelos diversos tecidos afetados (BHARTI et al., 2003).

Os mecanismos exatos pelos quais as leptospiros causam disfunções orgânicas e danos podem variar entre sistemas orgânicos e diferentes hospedeiros (SCHULLER et al., 2015). Após a penetração no hospedeiro por meio da pele ou mucosas, as leptospiros patogênicas rapidamente estabelecem uma infecção sistêmica através da disseminação por via hematogênica. Esta fase é caracterizada por uma bacteremia (leptospiremia) e representa um período de incubação com duração média de sete a doze dias (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Durante esta fase inicial, as leptospiros evadem da resposta imune do hospedeiro por meio da ativação e ligação à inibidores do sistema complemento presentes em sua superfície (proteases) (BARBOSA et al., 2009). Constituídas de flagelos, que conferem uma alta motilidade, auxiliando no processo de translocação celular e migração através dos

tecidos (FAINE, 1999), as leptospirosas também exibem uma quimiotaxia pela hemoglobina, proporcionando benefícios no metabolismo férrico e na migração pelos tecidos do hospedeiro (LUX; MOTER; SHI, 2000).

Em seguida, por via hematogênica, as leptospirosas se disseminam para órgãos e tecidos como rins, fígado, pulmões, baço, células endoteliais, retina, músculos esqueléticos e cardíacos, meninges, pâncreas e trato genital (SCHULLER et al., 2015). Após a carga bacteriana no sangue e tecidos atingir uma concentração crítica, manifestam-se as lesões e sinais decorrentes da liberação de componentes celulares tóxicos e da ação de toxinas leptospirais. A literatura retrata a lesão primária como um dano ao endotélio (vasculite) de pequenos vasos sanguíneos, com posterior isquemia localizada e danos hepatocelular e pulmonar, necrose tubular renal, meningite, miosite e placentite (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Nos caninos, os órgãos mais acometidos na leptospirose são os rins e o fígado e as principais consequências de danos estruturais e funcionais estão relacionadas a respostas imunomediadas, distúrbios hemodinâmicos, distúrbios inflamatórios e lesão direta pela presença de leptospirosas nos tecidos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; SCHULLER et al., 2015). A afecção desses órgãos é resultado da ação de fatores de virulência que incluem adesinas, hemolisinas, esfingomielinases, fosfolipases e porinas, que fornecem às bactérias a capacidade de invadir, aderir, colonizar e evadir o sistema imune dos hospedeiros (BHARTI et al., 2003; PICARDEAU, 2017).

As lesões renais predominantes incluem a nefrite intersticial aguda, com necrose de células tubulares, apoptose e regeneração (DE BRITO et al., 2006; PAZ et al., 2021; DIAS et al., 2021). A literatura também descreve que as lesões tubulares ocorrem devido aos efeitos diretos da presença de *Leptospira* (DE BRITO et al., 2006), pois os componentes da membrana externa leptospiral induzem inflamação em células do epitélio tubular e dano celular *in vitro* (YANG; WU; PAN, 2001). No entanto, reduções na taxa de filtração glomerular também foram descritas nos cães em infecções experimentais com leptospirose, o que indica o envolvimento glomerular estrutural e funcional (MASTRORILLI et al., 2007, SCHULLER, 2013).

Afecções hepáticas incluem hepatite colestática com ruptura completa ou parcial da placa hepática, necrose hepatocelular, binucleação de hepatócitos, edema periportal com infiltrado celular inflamatório agudo e crônico, além de proliferação de células Kupffer ao longo do revestimento sinusoidal (MIYAHARA et al., 2014). A hiperbilirrubinemia mostrou estar associada a invasão das junções intercelulares hepáticas devido a migração de leptospirosas e subsequente interrupção dos canais biliares (MIYAHARA et al., 2014). Dessa forma, os danos

hepatocelulares gerados e a persistência do organismo no tecido resultam em modificação na circulação hepática (DE BRITO et al., 2006; GREENLE et al., 2005; NALLY et al. 2004).

4.5 SINAIS CLÍNICOS

A leptospirose apresenta uma variedade de manifestações clínicas, desde formas subclínicas até quadros mais severos e potencialmente fatais (SCHULLER et al., 2015). Infecções que cursam com serovares adaptados ao hospedeiro geralmente apresentam sinais clínicos brandos ou ausentes, o que caracteriza os portadores como assintomáticos. Situação contrária é observada em infecções determinadas por cepas não adaptadas ou incidentais, onde a doença tende a manifestar um quadro severo que cursa com acometimentos sistêmicos em múltiplos órgãos (BHARTI et al., 2003; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Os cães desenvolvem a doença na sua forma hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica (LANGSTON; HEUTER, 2003). De forma geral, as manifestações clínicas descritas incluem anorexia, vômitos, letargia, dor abdominal, icterícia, diarreia, desidratação e febre (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Na infecção hiperaguda, os cães apresentam leptospiremia massiva e morte com poucos sinais clínicos (GOLDSTEIN, 2010). Quanto ao tempo de apresentação clínica, a forma aguda tem duração de um a dois dias, enquanto a subaguda ocorre dentro de dois a sete dias, aproximadamente (KOHN et al., 2010; SYKES et al. 2011; VAN DE MAELE et al., 2008). Na leptospirose aguda, os sinais clínicos predominantes estão relacionados a distúrbios hemodinâmicos e alterações na coagulação responsáveis por sangramentos, presença de hematêmese, hematoquesia, melena, epistaxe e petéquias (KOHN et al. 2010; SCHULLER et al., 2015). Sinais como febre e icterícia são pouco frequentes em estágios iniciais da doença, portanto os mesmos não devem ser avaliados de forma única e estrita em uma suspeita clínica de leptospirose (GOLDSTEIN, 2010).

As infecções subagudas caracterizam-se por progressiva injúria em diferentes tecidos e órgãos, com principal acometimento das funções renal e hepática (SYKES et al., 2011). Os sinais clínicos relacionados ao envolvimento renal incluem polidipsia e poliúria, acompanhados ou não de azotemia como uma consequência da disfunção tubular ou resistência adquirida à vasopressina (MAGALDI et al., 1992; DIAS et al., 2021). Os cães podem apresentar dano em interstício renal, com consequente proteinúria, glicosúria e perda da capacidade de concentração urinária (TOCHETTO et al., 2012). Quando os casos progridem, alterações como nefrite intersticial aguda e acometimentos a nível glomerular podem ocorrer, com consequente

desarranjo tubular, hemorragias e perda de glomérulos (MAJOR; SCHWEIGHAUSER; FRANCEY, 2014; SCHULLER et al., 2015). O envolvimento hepático pode variar de discretas elevações nas concentrações de enzimas hepáticas, com ou sem hiperbilirrubinemia, a uma insuficiência hepática grave (SCHULLER et al., 2015). Dores muscular e abdominal também são descritas e podem estar relacionadas a miosite, meningite e/ou inflamação em outros órgãos, como os rins, fígado e pâncreas (SCHULLER et al., 2012).

A presença de infiltrados alveolares, intersticiais ou peribronquiais seguidos de sinais respiratórios, como tosse e dispneia foram descritos (KOHN et al., 2010; SCHULLER et al., 2015). As causas podem ser diversas, incluindo edema pulmonar, pneumonia ou Síndrome Pulmonar Hemorrágica da Leptospirose (SPHL). Cães com SPHL desenvolvem hemorragia intra-alveolar multifocal, que pode ser rapidamente progressiva, culminando em hemoptise maciça e insuficiência respiratória (KOHN et al., 2010). Nally e colaboradores (2004) em um estudo utilizando cobaias observaram respostas autoimunes com deposição de imunocomplexos causando danos indiretos ao tecido pulmonar, também descrita como uma possível etiologia para o quadro respiratório.

Em cães com leptospirose, diferentes alterações oftalmológicas, como lacrimejamento, descarga mucopurulenta, reflexos pupilares reduzidos, panuveíte, conjuntivite, descolamento de retina e hemorragias retinianas foram descritas (SCHULLER et al., 2015). Intussuscepção intestinal também foi descrita como uma complicação relacionada à leptospirose e presumivelmente está associada à inflamação gastrointestinal e distúrbios da motilidade (íleo paralítico) (SCHULZ et al. 2010; SONET et al., 2018; TOCHETTO et al., 2012).

Os achados clínico-patológicos são inespecíficos e podem refletir anormalidades em sistemas circulatório, renal, hepático e urinário. As anormalidades hematológicas mais frequentes são anemia, que varia de leve a moderada, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose e neutrofilia acompanhada, em alguns momentos, de desvio a esquerda e monocitose (KOHN et al., 2010; SCHULLER et al., 2015). As anormalidades mais comuns no perfil bioquímico são aumento nas concentrações séricas de ureia e creatinina, decorrentes de uma insuficiência renal aguda e injúrias hepáticas, evidenciadas por diferentes graus de comprometimento, refletidas no aumento da atividade sérica de enzimas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), e hiperbilirrubinemia (GEISEN et al., 2007; GOLDSTEIN et al., 2006; TANGEMAN; LITTMAN, 2013).

4.6 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico clínico da leptospirose é complexo, uma vez que os sinais clínicos apresentados são inespecíficos e variam consideravelmente entre os animais domésticos (MIOTTO et al., 2018). Para uma maior precisão na confirmação do diagnóstico são necessárias abordagens tanto no âmbito clínico como laboratorial, com a utilização associada de métodos diagnósticos específicos (PICARDEAU, 2013). É importante enfatizar que a utilização associada dos testes é uma estratégia que aumenta as chances de se confirmar o diagnóstico em indivíduos infectados (MIOTTO et al., 2018). Os métodos diagnósticos disponíveis possuem vantagens, mas também algumas limitações e a acurácia destes depende de variáveis como o estágio da infecção, soroconversão e epidemiologia da doença (SCHULLER et al., 2015).

Vale ressaltar que a sensibilidade de cada método diagnóstico varia de acordo com a amostra biológica de escolha (fluidos, sangue, urina e tecidos) e o estágio de infecção no qual o hospedeiro se encontra (MIOTTO et al., 2018). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de testes indiretos, que detectam anticorpos anti-*Leptospira* spp., ou testes diretos, que visam a identificação do agente ou de seu material genético em diversos tipos de amostras (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI et al., 2003).

4.6.1 Métodos diretos

A observação direta de leptospiros por microscopia de campo escuro não deve ser utilizada como abordagem de diagnóstico única, pois trata-se de uma técnica difícil e que possui reduzida especificidade (SCHULLER et al., 2015; CAMERON, 2015). O diagnóstico pode ser obtido por exame direto e são necessárias aproximadamente 10^4 leptospiros/mL em amostras clínicas para adequada visualização microscópica. Tal técnica requer treino e experiência por parte do examinador, uma vez que a presença de outras bactérias, artefatos e detritos celulares pode ocasionar resultados falso positivos (PICARDEAU, 2013).

Nos últimos anos, a PCR tem sido cada vez mais utilizada como uma ferramenta para confirmação diagnóstica na leptospirose. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, estudos relatam que esta técnica se mostra eficaz e aumenta a precisão diagnóstica, principalmente quando associada a testes sorológicos (MIOTTO et al., 2018). Outra vantagem da PCR, considerando a patogênese da doença, é a capacidade de diagnóstico precoce, principalmente em casos de infecções agudas, quando o sistema imunológico ainda não foi capaz de gerar títulos de anticorpos detectáveis (LOUREIRO et al., 2013), ou crônicas, onde os

níveis de anticorpos podem ser baixos (CARVALHO et al., 2011). Esta técnica também se destaca pela capacidade de detectar carreadores crônicos assintomáticos em amostras de tecido e urina (MIOTTO et al., 2016; PINNA et al., 2018).

A PCR se enquadra em duas categorias baseadas na detecção de genes alvo. Os que estão universalmente presentes nas bactérias, como gene 16S rRNA ou *rrs* (MERRIEN et al., 1992) e os genes restritos a *Leptospira* spp. patogênicas, como *lipL32* (HAMOND et al., 2014; STODDARD et al., 2009), *gyrB* (SLACK et al., 2006) e *secY* (AHMED et al., 2009). Recentemente, a PCR quantitativa através de sondas TaqMan e de fluorescência SYBR Green vem se destacando como substituta à técnica convencional, uma vez que fornece resultados mais rápidos e é menos sensível a contaminações (AHMED et al., 2009). Adicionalmente, ambas as sondas também permitem a quantificação de DNA, fornecendo informações quanto à carga bacteriana e prognóstico do paciente (BHARTI et al., 2003).

A obtenção de isolados autóctones a partir de amostras biológicas é considerada método padrão para o diagnóstico da leptospirose (CAMERON, 2015). A utilização de antibióticos seletivos, meios enriquecidos, o crescimento fastidioso e o longo período demandado para obtenção do isolado, tornam os resultados tardios e a técnica dispendiosa (SCHULLER et al., 2015). Por esses motivos, esta abordagem não é considerada útil como teste de rotina para o diagnóstico de pacientes clínicos, mas permanece importante em pesquisas com fins epidemiológicos, pois permite a identificação da espécie e do serovar infectantes e é essencial para o estabelecimento de estratégias de controle e prevenção da doença (CAMERON, 2015).

4.6.2 Métodos indiretos

O MAT é a abordagem sorológica mais frequentemente usada para o diagnóstico da leptospirose animal e recomendada pela OIE como método de referência na detecção de anticorpos específicos (OIE, 2018). O teste tem como base detectar reações aglutinantes entre anticorpos presentes no soro e serovares de leptospiras vivas *in vitro*. Ressalta-se que esta é uma técnica sorogrupo específica, onde uma reação para um serovar no MAT sugere exposição a um serovar pertencente a um determinado sorogrupo (LEVETT, 2001). Portanto, é importante destacar a necessidade da utilização de uma bateria de antígenos vivos com sorogrupos representativos segundo a epidemiologia na região e isolados locais, uma vez que um painel incompleto pode ser responsável por resultados falso negativos em animais infectados (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

O diagnóstico é definido com a observação da presença ou não de aglutininas e o título final é determinado por meio da maior diluição do soro que apresentar pelo menos 50% das leptospiras aglutinadas. Conforme preconizado pela OIE, para triagem inicial que indica exposição prévia dos animais ao agente, o título estabelecido é ≥ 100 . Títulos ≥ 800 oriundos de animais com sinais clínicos e não vacinados são sugestivos de infecção ativa. Muitas vezes são necessárias amostras pareadas, onde a elevação na titulação de anticorpos igual ou superior a quatro vezes confere um resultado positivo (PICARDEAU, 2013; SCHULLER et al., 2015).

A precisão do MAT no diagnóstico varia e depende do estágio de infecção em que o paciente se encontra (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A resposta humoral no hospedeiro geralmente ocorre entre a segunda e quarta semana e caracteriza-se por um aumento considerável nos títulos de anticorpos (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2013). Diante desse aspecto, o MAT apresenta uma elevada sensibilidade para detecção de IgM e IgG somente neste estágio da infecção. Entretanto, uma baixa sensibilidade da técnica, tanto na fase inicial de infecção aguda como em casos crônicos, é evidenciada, onde os títulos de anticorpos produzidos pelo sistema imune podem ser indetectáveis ou muito baixos (OIE, 2018). Tais características possibilitam a ocorrência de resultados falso negativos em amostras de pacientes em ambas as situações clínicas citadas anteriormente (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Adicionalmente, o histórico vacinal do animal deve ser considerado por ocasião da interpretação do diagnóstico sorológico (MARTIN et al., 2014; OIE, 2018).

Como a leitura é subjetiva e podem ocorrer variações dentro e entre laboratórios, o método requer completo treinamento e experiência por parte dos observadores (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Outras limitações incluem a possibilidade de reação cruzada entre serovares e espécies distintas (LOUREIRO et al., 2013; MUSSO; LA SCOLA, 2013) e o risco de infecção durante a manipulação das culturas vivas pelos pesquisadores (AHMAD; SHAH; AHMAD, 2005).

4.7 TRATAMENTO

O tratamento da doença em caninos consiste de antibioterapia e suporte. Entre as condutas terapêuticas, as que mais se destacam incluem a hidratação, correção dos distúrbios hidroeletrólíticos, administração de protetores hepático e gástrico (GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006). Conforme alguns estudos *in vitro* (CHAKRABORTY et al., 2010; LIEGEON; DELORY; PICARDEAU, 2018; SUEPAUL et al., 2015) e *in vivo* (GUTIERREZ et al., 2019; GRIFFITH et al., 2007; MAURO; HARKIN, 2019; TRUCCOLO

et al., 2002), antimicrobianos como doxiciclina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, quinolonas e macrolídeos mostraram-se eficazes na eliminação bacteriana e tratamento da leptospirose. No entanto, devido ao limitado número de estudos clínicos randomizados e prospectivos avaliando o tratamento da leptospirose em cães, as recomendações geralmente são baseadas em observações clínicas pontuais e não controladas (SCHULLER et al., 2015).

Os antibióticos usados na leptospirose humana e canina tipicamente incluem derivados de penicilina associados a doxiciclina, sendo esta última também utilizada para eliminação da persistência intrarrenal (FAINE, 1999; SCHULLER et al., 2015). Conforme recomendações do consenso europeu e norte-americano, a terapêutica antimicrobiana inicial tende a ser variável dependendo do paciente e sua tolerância à administração oral de doxiciclina. Como cães com leptospirose geralmente apresentam sinais gastrointestinais além de dano renal agudo com consequente azotemia, os mesmos podem não tolerar bem a doxiciclina oral e a terapia inicial com um derivado da penicilina (penicilina G - 25.000-40.000 U/kg IV a cada 12 h, ampicilina – 20mg/g IV a cada 6 h ou 20-30 mg/kg de amoxicilina a cada 6-8h) é frequentemente recomendada para interromper a bacteremia até que a doxiciclina possa ser usada (5 mg/kg a cada 12h ou 10 mg/kg a cada 24h por 14 dias) (SCHULLER et al., 2015; SYKES et al., 2011). Em contraste, em situações em que a terapia oral é possível, alguns trabalhos reportam a administração apenas da doxiciclina (5mg/kg a cada 12 horas por 21 dias), visto que este quimioterápico se mostra eficaz na eliminação bacteriana nos tecidos do hospedeiro e na resolução do status de carreador crônico (GOLDSTEIN, 2010).

Mauro e Harkin (2019) demonstraram leptospirúria persistente confirmada por PCR de urina em cinco cães, em até 48 dias após início do tratamento com diferentes protocolos usando ampicilina, doxiciclina, amoxicilina e enrofloxacina por até 28 dias. Em dois cães, a leptospirúria foi resolvida após mudança na terapêutica para enrofloxacina. Em três cães, a doxiciclina e/ou enrofloxacina foram ineficazes na eliminação da leptospirúria, que em seguida foi resolvida após a terapia com claritromicina (MAURO; HARKIN, 2019). Entretanto, é importante salientar que a leptospirúria observada nos dias 10 e 11 após início do tratamento era previsível, uma vez que estudos reforçam a necessidade de períodos extensos de antibioticoterapia para obtenção completa da cura bacteriológica (GOLDSTEIN, 2010).

Em muitos estudos terapêuticos, o sucesso nos tratamentos é evidenciado por diferentes métodos, como PCR convencional e tempo real (MAURO; HARKIN, 2019), microscopia de campo escuro (JUVET et al., 2011) e bioluminescência em tecidos e fluidos de ratos infectados (RATET et al., 2014). Na PCR convencional de urina, a detecção de material genético de *Leptospira* não necessariamente indica que estas estão viáveis (MAURO; HARKIN, 2019). A

microscopia de campo escuro é uma ferramenta com reduzida sensibilidade para detecção da excreção urinária de *Leptospira*, portanto, apesar de resultados negativos na microscopia, a excreção contínua de reduzida concentração de bactérias não pode ser descartada (JUVET et al., 2011). Por outro lado, a associação da PCR em tempo real com a bioluminescência, podem demonstrar viabilidade dos microrganismos, resultando em técnicas mais sensíveis (RATET et al., 2014). De modo geral, estas abordagens tornam os resultados variáveis, enfatizando a necessidade de mais estudos e uma melhor padronização quanto à análise dos dados (MAURO; HARKIN, 2019; RATET et al., 2014).

Diferentes grupos de drogas foram propostos na antibioticoterapia da leptospirose canina, e dentre eles os β -lactâmicos, tetraciclinas e fluoroquinolonas se destacam (GUTIERREZ et al., 2019; SCHULLER et al., 2015). Os antibióticos β -lactâmicos são antimicrobianos frequentemente prescritos, os quais têm em comum estrutura e mecanismo de ação – a inibição da síntese da parede celular bacteriana de peptidoglicano. Essa classe de fármacos inclui as penicilinas, as cefalosporinas e carbapenêmicos (PETRI, 2012a). Muitos desses fármacos apresentam vantagens peculiares, de modo que os membros deste grupo de antibióticos são os preferidos atualmente para o tratamento de muitas doenças infecciosas (PETRI, 2012a).

As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) são antibióticos que tem atividade antibacteriana semelhante e espectro de ação mais amplo que as penicilinas G e V. Trata-se de drogas bactericidas para microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A ampicilina é estável em ácido e bem absorvida depois da administração oral, entretanto a ingestão de alimento antes da administração da ampicilina diminui a sua absorção. Quando administrada de forma injetável, a droga atinge concentrações plasmáticas maiores se comparada a via oral. A ampicilina tem boa distribuição no plasma, é encontrada na bile, tem circulação êntero-hepática e é excretada em quantidades apreciáveis nas fezes. Ressalta-se que a existência de disfunção renal grave prolonga acentuadamente a persistência da ampicilina no plasma (PETRI, 2012a).

A amoxicilina é uma penicilina semissintética e se mostra estreitamente relacionada com a ampicilina dos pontos de vista químico e farmacológico. O fármaco é estável em ácido e foi desenvolvido para o uso oral. A amoxicilina é absorvida mais rápida e completamente pelo trato gastrointestinal que a ampicilina, sendo esta a principal diferença entre as duas. As concentrações plasmáticas máximas de amoxicilina são 2-2,5 vezes maiores que as da ampicilina depois da administração oral de uma dose idêntica. A presença de alimento não interfere na absorção e embora a meia-vida da amoxicilina seja semelhante à da ampicilina, as

concentrações plasmáticas eficazes da amoxicilina administrada por via oral persistem por um intervalo duas vezes maior que a ampicilina. Em torno de 20% da amoxicilina ligam-se às proteínas plasmáticas e este valor é semelhante ao da ampicilina. A maior parte de uma dose do antibiótico é excretada em sua forma ativa na urina (PETRI, 2012a)

As tetraciclinas são agentes antimicrobianos bacteriostáticos e inibidores da síntese de proteínas que atuam sobre os ribossomos. Destaca-se que a doxiciclina é um derivado semissintético da classe e, em virtude de sua atividade contra *Rickettsia*, bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas, Gram-negativas e *Chlamydia*, tornaram-se conhecidas como antibióticos de “amplo espectro”. São eficazes também contra alguns microrganismos, como *Coxiella burnetti*, *Mycoplasma pneumoniae* e espiroquetas, incluindo *Borrelia burgdoferi* e *Leptospira* spp. (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012; NATIONAL INSTITUTES OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASE, 2019). Estes fármacos penetram nas bactérias Gram-negativas por difusão passiva, através dos canais hidrofílicos formados pelas proteínas porinas da membrana celular externa, bem como por transporte ativo, por um sistema dependente de energia que bombeia todas as tetraciclinas através da membrana citoplasmática (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012). A doxiciclina tem excelente disponibilidade oral e ampla distribuição e penetração nos tecidos e secreções, incluindo vias respiratórias superiores, pele, tecidos moles e urina. As tetraciclinas, de forma geral, acumulam-se também nas células reticuloendoteliais do fígado, do baço e da medula óssea, bem como no osso, na dentina e no esmalte dos dentes (NATIONAL INSTITUTES OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASE, 2019).

A principal via de eliminação da maioria das tetraciclinas é pelo rim, embora sejam também encontradas no fígado e excretadas parcialmente pela bile (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012). A doxiciclina é amplamente excretada na sua forma ativa tanto na bile quanto na urina e no seu uso clínico para resolução da infecção em trato urinário de cães com leptospirose, a droga apresenta boa eficácia (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012; SCHULLER et al., 2015). Allen, Buckley e Schaer (2016) confirmaram esta eficácia em um cão com hipocalcemia grave e lesão renal aguda, decorrentes de um quadro grave de leptospirose, onde a terapia com amoxicilina foi suspensa e substituída por doxiciclina (5 mg/kg, via oral a cada 12 h por 21 dias) após confirmação diagnóstica. No retorno após 21 dias, o exame clínico geral revelou um cão clinicamente normal.

Fluoroquinolonas são agentes bactericidas e representam um avanço terapêutico particularmente importante. Tais fármacos tem ampla atividade antimicrobiana e mostram-se eficazes depois da administração oral para o tratamento de grande variedade de doenças

infeciosas. Os antibióticos quinolônicos tem como alvo a DNA-girase e a topoisomerase IV, necessárias para a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano (HOOPER, 2005). Para muitas bactérias Gram-positivas, a inibição da atividade da topoisomerase IV é a principal via de ação das quinolonas. Em contraste, para muitas bactérias Gram-negativas, o principal alvo das quinolonas é a DNA-girase. Esses fármacos inibem o superespirilamento do DNA mediado pela girase em concentrações que se correlacionem adequadamente com as necessárias para inibir o crescimento bacteriano. As fluoroquinolonas são bem absorvidas depois da administração oral e distribuem-se amplamente pelos tecidos do corpo. Os níveis séricos máximos de ciprofloxacina são alcançados em 1-3 horas após sua administração e os alimentos não reduzem a absorção oral, mas podem prolongar o intervalo até alcançar as concentrações séricas máximas. O volume de distribuição das quinolonas é grande e suas concentrações na urina, nos rins, nos pulmões, próstata, fezes, na bile, nos macrófagos e nos neutrófilos são maiores que os níveis séricos. Ressalta-se que a ciprofloxacina apresenta ótima eficácia no tratamento de infecções do trato urinário, uma vez que é eliminada predominantemente pelos rins (PETRI, 2012b).

Vale salientar que o tratamento precoce de cães infectados e com uma intervenção adequada é extremamente importante para a resolução da infecção e controle da doença (SCHULLER et al., 2015). Com base nas alterações sistêmicas causadas pela leptospirose, com particular atenção para o acometimento da função renal, é importante que a fluidoterapia concomitante ao uso dos antimicrobianos seja realizada para prevenir e auxiliar no tratamento da lesão renal aguda (GOLDSTEIN, 2010).

4.8 TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Avaliar e quantificar a viabilidade de um microrganismo é um ponto básico e fundamental na microbiologia. Este processo é importante quando se busca avaliar a eficácia de um antibiótico ou outro composto antimicrobiano de forma determinante e precisa (MOUVILLE; BENAROUDJ, 2020). Tal avaliação envolve sistemas complexos e o método mais sensível e aplicado para *Leptospira* spp. é o ensaio com o uso de indicador de atividade metabólica celular, denominado Alamar Blue® (AB) (MURRAY; HOSPENTHAL, 2004). Dentre as técnicas disponíveis para tal finalidade, a microdiluição em caldo se mostra como uma das mais promissoras, surgindo como uma alternativa nas pesquisas envolvendo a susceptibilidade antimicrobiana em *Leptospira* spp. (MOUVILLE; BENAROUDJ, 2020; MURRAY; HOSPENTHAL, 2004). Trata-se de um ensaio simples, de única etapa e de alto

rendimento, onde a presença de atividade metabólica resulta em alteração química, com consequente mudança na sua cor (MOUVILLE; BENAROUDJ, 2020).

Este método usa a resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxasin-10-ium-3-one), um cromógeno sequestrador de elétrons, o qual é reduzido em resorufina por meio de oxidorreduções celulares que utilizam a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) como cofator. A resazurina é um reagente não fluorescente azul, enquanto a resorufina é um reagente rosa altamente fluorescente. Quando associado às células vivas, o indicador de redução resazurina produz uma alteração colorimétrica e um sinal fluorescente em resposta a atividade celular metabólica, transformando-se no reagente rosa resorufina. Quando associado às células mortas, não há alteração colorimétrica fluorescente e, portanto, a forma oxidada à base de resazurina (reagente azul), permanece inalterada. A redução da resazurina pode ser determinada qualitativamente pela observação da mudança visível da cor ou quantitativamente por meio da leitura de absorvância em espectrofotometria, tornando a avaliação mais sensível. (MOUVILLE; BENAROUDJ, 2020).

A microdiluição em caldo utilizando o reagente AB é mais sensível que a técnica tradicional de macrodiluição, apresenta um bom rendimento, é de fácil execução, pois não requer um grande número de etapas e, portanto, compatível com processamento de várias amostras (MURRAY; HOSPENTHAL, 2004). A redução da resazurina pode ser visível depois de algumas horas, e a alteração na cor é estável por muitos dias. Além disso, há uma flexibilidade no perfil de análise dos dados (qualitativo ou quantitativo). A avaliação da viabilidade de microrganismos utilizando o AB, tem sido amplamente utilizada com bactérias (THIBEAUX et al., 2020), ensaios de sensibilidade fúngica na forma planctônica e biofilme (REPP; MENOR; PETTIT, 2007) e em ensaios de citotoxicidade em cultura de células cancerígenas de humanos (UZUNOGLU et al., 2010).

O motivo pelo qual a técnica de microdiluição é considerada mais sensível que a técnica de macrodiluição é que a última depende de observações visuais de *Leptospira* spp. por microscopia de campo escuro. Isso pode ser difícil, principalmente quando há presença de artefatos e poucos microrganismos presentes na cultura (SUEPAUL et al., 2015). Por outro lado, a técnica de microdiluição detecta a atividade celular metabólica, a qual resulta em uma mudança de cor facilmente detectável (MURRAY; HOSPENTHAL, 2004; SUEPAUL et al., 2015). Dessa forma, esta técnica auxilia na identificação de perfis de resistência e na seleção de agentes antimicrobianos para posterior avaliação em modelos terapêuticos com tratamentos em animais e humanos ou ensaios de profilaxia.

4.9 BIOFILME - SAÚDE HUMANA, ANIMAL E AMBIENTE

O fenótipo de biofilme foi reconhecido na história médica recentemente e tem se tornado claro que o desenvolvimento de muitas infecções depende da formação do mesmo (MARRIE; NELLIGAN; COSTERTON, 1982). Essas comunidades microbianas são onipresentes em quase todos os ambientes (PARSEK; SINGH, 2003). O termo biofilme, originalmente usado em microbiologia técnica e ambiental, foi introduzido na medicina em 1982 por Costerton, após observar que o *Staphylococcus aureus* havia formado biofilme em um eletrodo de marca-passo cardíaco (MARRIE; NELLIGAN; COSTERTON, 1982).

Historicamente, humanos e animais são acometidos por infecções bacterianas associadas com biofilmes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004), culminando em processos de endocardite, osteomielite, sinusite, infecções do trato urinário, periodontite, infecção pulmonar crônica, otite e processos sistêmicos (DEL POZO; PATEL, 2007). Doenças relacionadas ao biofilme contribuem para a morbidade do paciente e aumentam as taxas de mortalidade, representando considerável carga econômica nos custos de hospitalização (DAROUICHE, 2004). Tais infecções comprometem a qualidade de vida não somente de humanos como de animais, podem ser fatais e muitas vezes são atribuídas a espécies bacterianas presentes na água, no ar, no solo ou na pele de seus hospedeiros (DEL POZO, 2018).

Diversos estudos reportaram a formação de agregados bacterianos e/ou detecção de material genético de bactérias em biofilmes ambientais e objetos inanimados, como os observados por Lister e Horswill (2014) em *Staphylococcus aureus*, (VINOD KUMAR et al., 2015) e (THIBEAUX et al., 2017) com *Leptospiras* patogênicas, Hoiby e colaboradores (2010) com *Escherichia coli*, e Declerck (2010) com *Legionella pneumophila*. Estas documentações representam um problema em saúde pública, visto que diversos microrganismos que sobrevivem no ambiente formam biofilmes, possuem potencial patogênico e já foram documentados como responsáveis por infecções em hospedeiros susceptíveis (HOIBY et al., 2010).

Uma exemplificação desta interação agente infeccioso – ambiente – hospedeiro, é o estudo realizado por Thibeaux e colaboradores (2017) que investigou a presença ambiental e a sobrevivência de leptospiras patogênicas em áreas onde foram relatados casos recentes de leptospirose humana. Embora a detecção de leptospiras em amostras ambientais seja difícil, os autores conseguiram detectar o agente em 58% (30/52) das amostras de solos, de 4 diferentes sítios distribuídos em 3 municípios onde ocorreu o surto, e demonstraram que as leptospiras

patogênicas estavam viáveis e presentes no ambiente por várias semanas após o evento infectante. Outro estudo que demonstra essa relação entre ambiente, reservatórios e hospedeiros susceptíveis, foi o elaborado por Santos e colaboradores (2021), que identificaram a formação de biofilme por *Leptospira interrogans* em rins de hospedeiros reservatórios naturais (ratos) em 37% (65/24) dos animais avaliados em uma comunidade urbana de Salvador com situações precárias em saneamento básico e elevada incidência de leptospirose humana severa.

Interações entre *Leptospira* spp. e bactérias ambientais já foram relatadas. Diversos gêneros bacterianos, incluindo o *Azospirillum* e *Sphingomonas*, foram detectados juntamente com *Leptospira* spp. em biofilmes formados em água doce ou em sistemas de unidade de água para tratamento dental (VINOD KUMAR et al., 2015; SINGH et al., 2003). A formação de biofilme caracteriza-se como um mecanismo de virulência, apresentando-se como um risco à saúde humana e animal, visto que o aumento da resistência antimicrobiana, maior sobrevivência ambiental e potencial para causar infecções recorrentes são fatores relacionados à formação de biofilmes (GLOAG et al., 2020).

Nos últimos anos, os trabalhos de pesquisa têm se concentrado principalmente em infecções associadas à biofilmes e estratégias de combate a estas comunidades microbianas (YIN et al., 2019). Desta forma, pensando na potencial capacidade de leptospirosas em formar biofilme e no caráter zoonótico da doença, uma maior compreensão sobre as estratégias de sobrevivência deste agente em hospedeiros e diversos ambientes é um passo fundamental para instituição de medidas profiláticas e de controle, que objetivem a resolução dessa problemática que atinge a saúde humana, animal e ambiental.

4.10 BIOFILME NA LEPTOSPIROSE

Evolutivamente, a maioria dos microrganismos passou a desenvolver diferentes formas e mecanismos de sobrevivência que incluem a regulação do crescimento, heterogeneidade da população (biofilmes multiespécies) e adaptações às condições de estresse (KUMAR et al., 2017). Estudos demonstram que grande parte da atividade bacteriana no ambiente e nos hospedeiros não ocorre somente com as células individualizadas na forma planctônica, mas também com os microrganismos agrupados e organizados em biofilmes (LIU et al., 2016).

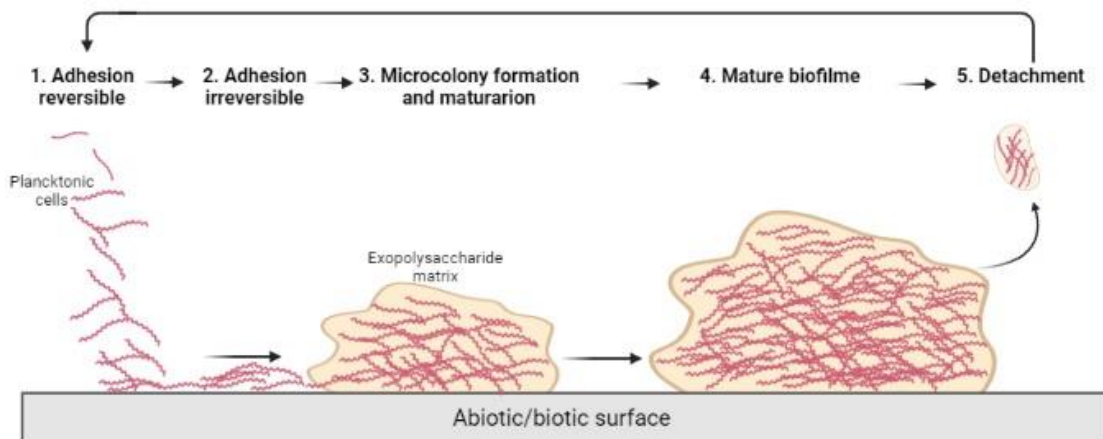
Biofilmes consistem em grupo de células bacterianas organizadas em diferentes graus de complexidade, aderidas à uma superfície biótica ou abiótica, e cercadas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS) (KUMAR et al., 2017; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). A formação do biofilme fornece ambiente ideal para transmissão de genes de

resistência e comunicação química entre as células, permitindo-as coordenarem sua atividade de crescimento e se agrupar em comunidades. Esta íntima interação também permite a formação de canalículos, responsáveis pela passagem de água, nutrientes, escoamento de resíduos e toxinas (LIU et al., 2016). Portanto, os biofilmes não são apenas camadas estratificadas de bactérias, mas sim um sistema biológico com microrganismos organizados em uma comunidade funcional e coordenada (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Diversas teorias foram propostas para a formação de biofilmes, porém certas etapas são amplamente conhecidas e concordantes, como a adesão, crescimento sésil, maturação e desprendimento; as mesmas sofrem influência do ambiente e de características genéticas individuais das bactérias (KUMAR et al., 2017; LIN et al., 2017). Os biofilmes são formados em ordem gradual e progressiva. Para tal formação, existe um ciclo composto de cinco estágios. No estágio I, ocorre a fase de fixação inicial à superfície. Esta etapa pode ser induzida por sinais ambientais, presença de nutrientes, temperatura, pH, concentração de oxigênio e de ferro. Adicionalmente, a síntese de adesinas, pili e polissacarídeos pode influenciar o processo de fixação inicial a um substrato (APARNY; YADAV, 2008).

Após o primeiro estágio, as bactérias precisam manter o contato com uma superfície e, para que desenvolvam um biofilme maduro, é necessário que a adesão se torne irreversível. Para isso precisam se multiplicar e ancorar seus apêndices, caracterizando o estágio II. Após a adesão irreversível, as bactérias emitem sinais químicos que auxiliam na comunicação bacteriana. A partir do momento em que a intensidade do sinal excede um limiar, os mecanismos genéticos subjacentes para a produção de exopolissacarídeos são ativados, com o estágio III de desenvolvimento, também conhecido como maturação I, resultando na produção da matriz exopolimérica (JOHN; DONALE, 2007). O estágio IV ou maturação II (biofilme maduro) se inicia quando o biofilme alcança sua espessura final. Nesta fase, o biofilme adquire uma arquitetura tridimensional complexa com canais e poros, onde é possível observar propriedades como densidade, espessura e forma. O estágio V é definido pela dispersão celular. Este é o termo utilizado para caracterizar o destacamento das células de um biofilme. O destacamento é um evento fisiológico e regulado, que promove a transição das células de um biofilme para a forma planctônica (APARNY; YADAV, 2008; LIN et al., 2017). Uma representação desses estágios pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano



Fonte: Arquivo pessoal/ Imagem desenvolvida com o BioRender.com

Os biofilmes bacterianos estão envolvidos na patogênese de diversas doenças e representam um desafio para a saúde, contribuindo com aproximadamente 80% das infecções hospitalares recidivantes (DAVIES, 2003). As interações bacterianas em um biofilme conferem propriedades relevantes, como uma maior proteção e resistência à antimicrobianos, toxinas, radiação ultravioleta, salinidade, desidratação, oxidação, estresses ambientais e respostas imunológicas dos hospedeiros (FLEMMING; WINGENDER, 2010; LIN et al., 2017; LIU et al., 2016). As bactérias em biofilmes exibem propriedades distintas de suas formas planctônicas. Estudos relatam que infecções que cursam com a formação de biofilme podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos (CERI; OLSON; TURNER, 2010; OLSON et al., 2002).

Estudos *in vitro* verificaram que *Leptospira* spp. tendem a formar biofilme na interface ar-líquido e este comportamento provavelmente se deve ao fato destas bactérias serem móveis e aeróbicas estritas (RISTOW et al., 2008). Fatores relacionados ao estilo de vida e característica da espécie bacteriana também foram associados ao tempo necessário para a formação do biofilme (PICARDEAU et al., 2008; RISTOW et al., 2008). Sabe-se que espécies patogênicas demandam de um maior tempo para produção do biofilme quando comparadas às saprofíticas. Isto é explicado pelo crescimento fastidioso e o maior tempo de geração em leptospiros patogênicos, que podem retardar a taxa de aderência bacteriana e consequentemente a formação de biofilme (CAMERON, 2015).

A habilidade de *Leptospira* spp. permanecer viável em vários ambientes (como solo, água e hospedeiros mamíferos) sugere que essas bactérias possuam sistemas reguladores sensíveis e de ação rápida que lhes permitem adaptar-se a vários desafios ambientais (THIBEAUX et al., 2020). As interações entre espécies são essenciais para a persistência e o

desenvolvimento de qualquer tipo de comunidade complexa, e os biofilmes microbianos não são exceção (LIU et al., 2016). Estudo *in vitro* identificou a capacidade de leptospiros formarem biofilmes multiespécies com bactérias ambientais, e observaram que o microrganismo *Azospirillum brasilense* atuou como substrato para o desenvolvimento do biofilme, além de reduzir o tempo demandado para a formação do mesmo. Adicionalmente, também foi observada uma correlação positiva entre a formação de biofilme e o desenvolvimento de resistência das leptospiros quando expostas à antimicrobianos (VINOD KUMAR et al., 2015). É importante ressaltar que estudos recentes evidenciam a presença de Leptospiros patogênicos em biofilmes ambientais, sugerindo que tal estrutura tem papel relevante na habilidade destas bactérias sobreviverem em ecossistemas naturais (VINOD KUMAR et al., 2015; THIBEAUX et al., 2018).

Estudos prévios sugerem a formação de agregados nos túbulos renais proximais de ratos como possível causa para a persistência da infecção, definindo os hospedeiros como os principais reservatórios e carreadores urbanos (ATHANAZIO et al., 2008; SANTOS et al., 2015). A literatura reporta que ampla gama de espécies animais, quando infectadas, podem desenvolver condição de portadores renais, com a instalação e multiplicação de leptospiros nos túbulos renais e consequente eliminação para o ambiente em período variáveis e de forma intermitente (MIOTTO et al., 2018; LILENBAUM et al., 2008; PINNA et al., 2018)). Mais recentemente, Santos e colaboradores (2021) documentaram a formação de biofilme por leptospiros patogênicos em rins de hospedeiros reservatórios naturais (ratos), preenchendo uma lacuna na patogênese da leptospirose.

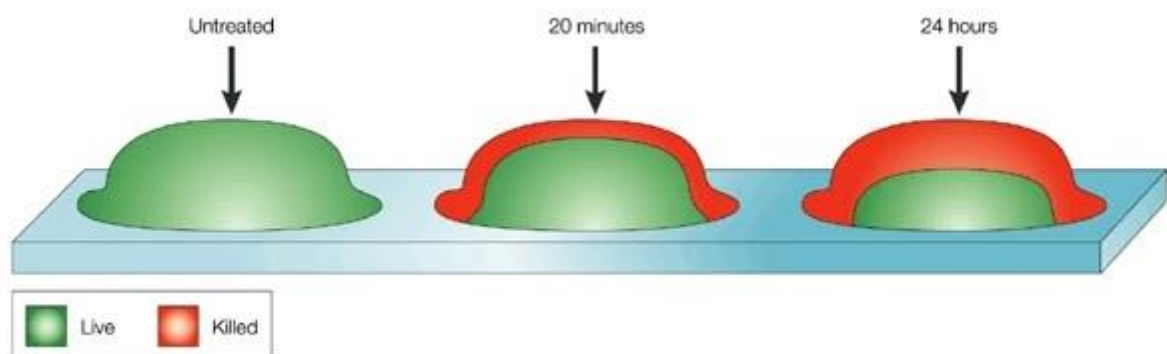
O *status* de carreador já foi associado a várias espécies, e estas incluem pequenos ruminantes (ALMEIDA et al., 2019; LILENBAUM et al., 2009), bovinos (NALLY et al., 2018; PINNA et al., 2018), suínos (STRUTZBERG-MINDER; KREIENBROCK, 2011) e roedores, tais como camundongo (*Mus musculus*) e rato-marrom ou ratazana (*Rattus norvegicus*) (ATHANAZIO et al., 2008; RATET et al., 2014). Estudos sugerem que a formação de biofilme nos túbulos renais pode atuar como uma barreira protetiva das bactérias, favorecendo o processo de evasão do sistema imune e conferindo maior resistência aos antibióticos com consequente persistência da infecção e eliminação de bactérias no ambiente (RATET et al., 2014; THIBEAUX et al., 2020).

4.10.1 Composição da matriz de biofilmes

A matriz estrutural do biofilme é complexa e a substância extracelular polimérica desempenha importante papel na sua composição. EPS são constituídos principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Estes fornecem a estabilidade mecânica dos biofilmes, mediam sua adesão às superfícies e formam uma rede polimérica coesiva e tridimensional que interconecta e imobiliza transitoriamente as células do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). O EPS é considerado componente essencial da matriz por envolver as bactérias em uma espécie de barreira mecânica e protegê-las de estresses como a ação física, variações de temperatura, radiação ultravioleta, drogas antimicrobianas e respostas imunes do hospedeiro (LIU et al., 2016). O conhecimento detalhado sobre a sua composição é fundamental para o entendimento da formação e estabilidade do biofilme (BALES et al., 2013).

Vários fatores foram sugeridos para explicar a complexa composição da matriz e conseqüentemente a elevada resistência das bactérias aos antimicrobianos: a formação compacta das estruturas do biofilme, as reduzidas taxas metabólicas e de crescimento nas áreas inativas e a proteção conferida pelos polímeros da matriz, são fatores que tornam os agentes químicos incapazes de destruir adequadamente as populações bacterianas (DAVIES, 2003; KUMAR et al., 2017). Quanto a atividade dos antibióticos contra uma população típica de biofilme, o tratamento inicial geralmente é eficaz para eliminar as bactérias apenas nas margens das microcolônias, entretanto, as bactérias estratificadas mais profundamente não são atingidas e conseqüentemente mortas (Figura 2). Tal aspecto geralmente resulta em morte incompleta, permitindo que as bactérias não afetadas atuem como um núcleo para a disseminação da infecção após a suspensão da terapia antibiótica (DAVIES, 2003).

Figura 2 – Resistência de biofilme à adição de antibiótico



Fonte: DAVIES, 2003

EPS produzidos por diversos microrganismos são formações hidrossolúveis com propriedades estruturais, físicas e químicas (LIU et al., 2016). Os constituintes da matriz em leptospiros ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, pesquisas genômicas envolvendo *L. biflexa* serovar Patoc sugerem que vários genes estão envolvidos na biossíntese de polissacarídeos (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004; REN et al., 2003). Aproximadamente 30 genes que codificam glicosiltransferases, capazes de sintetizar levans e dextrans, são encontrados nos genomas das espécies de *Leptospira* saprófitas e patogênicas. Adicionalmente, Ristow e colaboradores (2008), reportaram que os genes envolvidos na biossíntese de alginato (outro importante componente do EPS) estavam presentes em biofilmes de *L. biflexa* (11 genes) e *L. interrogans* (8 genes). Entretanto, estão ausentes em *Leptospira borgpetersenii*, o que pode justificar a reduzida sobrevivência ambiental desta espécie (BULACH et al. 2006). Estudos envolvendo leptospiros sugerem que o metabolismo da galactose pode desempenhar um papel central na produção de EPS e formação de biofilme. Adicionalmente, dois genes (*LEPBI_I0037* e *LEPBI_I2021*) relacionados ao metabolismo da galactose foram regulados positivamente durante o biofilme maduro de *Leptospira* (IRAOLA et al., 2016).

As proteínas expressas na matriz desempenham papel primordial na aderência, formação e estabilidade do biofilme. Grande número de genes de leptospiros que codificam proteínas hipotéticas com homologia limitada ou nula já foram identificados (IRAOLA et al., 2016). Em um experimento usando RNAseq em biofilme de *Leptospira biflexa* foram descobertos 289 de 575 (50%) genes expressos diferencialmente e classificados como genes codificadores de proteínas hipotéticas. Entre os cinco principais genes regulados no biofilme maduro, dois genes consecutivos (*LEPBI_I0858* e *LEPBI_I0859*) foram originalmente definidos como proteínas hipotéticas; no entanto, a anotação estrutural revelou em suas características uma provável atividade de lipase (IRAOLA et al., 2016) Essa é uma forte evidência de que os genes que codificam proteínas hipotéticas em *Leptospira* são genes verdadeiros e ativamente transcritos, cujas funções ainda precisam ser determinadas, abrindo novos campos de pesquisa neste ramo (IRAOLA et al., 2016).

Outra proteína que demonstrou importante papel na matriz de biofilmes é a GroEL, pertencente à família das chaperonas. Trata-se de uma proteína de choque térmico (PCT) essencial na formação de biofilme em bactérias Gram negativas e Gram positivas. Esta proteína é ativada em resposta ao estresse e tem importante papel na indução da geração ou alteração de proteínas envolvidas na adesão e manutenção do biofilme (GALLAHER et al., 2006; MATSUMI et al., 2015). Estudo recente com leptospiros, avaliou a expressão desta proteína

por PCR em tempo real e mostrou que durante a aderência de leptospiros na interface ar-líquido houve um aumento na regulação da GroEL, sugerindo sua participação durante o processo de formação de biofilme (VINOD KUMAR et al., 2016). As PCTs em condições normais de crescimento são expressas em níveis basais, mas aumentam sua produção em situações de estresse. Em leptospiros, esta condição pode ocorrer devido a temperaturas anormais, más condições nutricionais, fatores do hospedeiro e estresse oxidativo (LOURDAULT et al., 2011; TRUEBA et al., 2004).

Estudo recente identificou o diguanilato cíclico (c-di-GMP) e DNA extracelular como estruturas principais na constituição e formação de biofilme de *Leptospira interrogans* (THIBEAUX et al., 2020). O DNA extracelular mostrou ter um papel de coesão estrutural no biofilme, enquanto a molécula de sinalização intracelular (c-di-GMP) foi associada a uma maior produção e capacidade de suportar às tensões ambientais. Um monossacarídeo (N-acetil-D-glicosamina), o ácido N-acetilneuramínico e polissacarídeos extracelulares também foram identificados como estruturas presentes na matriz de biofilme. Por se tratar de abordagens ainda recentes, mais investigações são necessárias para elucidar a composição da matriz extracelular e o papel de biofilmes no gênero *Leptospira* (THIBEAUX et al., 2020).

4.11 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA LEPTOSPIROSE

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes em nível mundial, uma vez que apresenta consequências clínicas e econômicas (LOUREIRO et al., 2016). A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, mas que tem sofrido uma expansão acelerada devido a utilização inadequada destes fármacos, existindo uma clara correlação entre um maior consumo de antibióticos, o aumento na frequência de doenças infecciosas e níveis mais elevados de resistência bacteriana (WHO, 2011). A hospitalização prolongada e o uso de antibióticos diferentes dos de primeira linha aumentam de forma acentuada os custos do cuidado à saúde, o que constitui um problema relevante, considerando os recursos finitos que sustentam o sistema (LOUREIRO et al., 2016).

Atualmente, dois problemas principais afetam a eficácia dos antibióticos. O primeiro é que, após a introdução de um novo fármaco, como resposta a pressão seletiva de drogas e mutações, a resistência surgirá mais cedo ou mais tarde, o segundo é a crescente lacuna reconhecida entre o aumento da resistência antimicrobiana e o desenvolvimento de novas moléculas (LOUREIRO et al., 2016). Isso significa que o tempo para o desenvolvimento de

novos antibióticos é mais lento do que o surgimento e disseminação de mecanismos de resistência entre bactérias, que podem responder rapidamente à pressão seletiva e transmitir os genes de resistência enquanto se replicam (FERRI et al., 2017).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida por meio de mudanças genéticas como mutação e captação de material genético por transferência horizontal (ANDERSSON; HUGHES, 2019). Os mecanismos de transferência horizontal e os genes de resistência a medicamentos podem ser transmitidos de uma bactéria para outra através da troca de plasmídeos (fragmentos de DNA auto-replicantes extracromossômicos) transferidos por conjugação e por transdução (FERRI et al., 2017). Biofilmes desempenham papel fundamental neste processo, pois facilitam a manutenção dos plasmídeos ao longo do tempo, permitindo que sejam retidos nas partes inativas do biofilme, dominadas por células dormentes e, portanto, desprovidas de competição por crescimento (REN et al., 2014).

Sucessivos mecanismos que justificam o aumento da resistência em microrganismos formadores de biofilme já foram hipotetizados: reduzida penetração do antimicrobiano, inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ineficiência da droga devido a lenta taxa de crescimento bacteriano, e indução de alguns fenótipos de resistência, como a alteração na composição da membrana proteica (AGARWAL; SINGH; JAIN, 2010; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010). Outros mecanismos bacterianos fundamentais para resistir aos efeitos dos antimicrobianos, incluem a degradação enzimática da droga (destruição dos agentes beta-lactâmicos, pelas enzimas beta-lactamases), a prevenção do acúmulo intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular, existência de bombas de efluxo, alterações nas moléculas alvo dos antibióticos e a produção de moléculas alvo alternativas, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2007; MUNITA; ARIAS, 2016).

Na leptospirose, as espiroquetas podem desenvolver resistência aos antibióticos; porém estes mecanismos são complexos e ainda necessitam de pesquisas para elucidar os processos moleculares responsáveis (LIEGEON; DELORY; PICARDEAU, 2018). Há pouco conhecimento em nível genômico, mas vale ressaltar que a formação de biofilme pode contribuir de forma fundamental neste processo de resistência (KUMAR et al., 2017; LIU et al., 2016). Poucos plasmídeos foram isolados até o momento em leptospirosas patogênicas, e a maioria não carrega genes que conferem resistência (WANG et al., 2015; ZHU et al., 2014). A habilidade da leptospira em adquirir genes de resistência, como enzimas modificadoras ou degradantes por transferência horizontal, ainda se mostra limitada. Acredita-se que a alteração

nos locais-alvos dos antibióticos pode, portanto, ser a principal causa de resistência à antibióticos na leptospirose (LIEGEON; DELORY; PICARDEAU, 2018).

Testes de sensibilidade *in vitro* com leptospiros patogênicas são relatados usando isolados clínicos, mas ainda se mostram de uso mínimo na rotina clínica. (CHAKRABORTY et al., 2010; LIEGEON; DELORY; PICARDEAU, 2018). Tais estudos fornecem informações relevantes sobre a epidemiologia da doença, pressão de drogas comumente usadas, evolução da resistência bacteriana à antimicrobianos e tomada de decisões sobre estratégias antimicrobianas em nível populacional (SUEPAUL et al., 2015). Foi demonstrado experimentalmente que a exposição às drogas, em cultivo *in vitro*, pode resultar no desenvolvimento de resistência a espectinomicina e estreptomicina em leptospiros devido à mutação espontânea do gene alvo 16S rRNA e *rpsL*, respectivamente (POGGI; GIUSEPPE; PICARDEAU, 2010). Adicionalmente, uma investigação recente evidenciou a presença de um gene relacionado à resistência à tetraciclina (*tetA*) em leptospiros (MORENO et al., 2016). Outro estudo identificou genes de resistência antimicrobiana, como resistência a eritromicina (*ermA*) e tetraciclina (*tetA*), genes que codificam sistemas de efluxos contra multidrogas (*norM*), resistência a multidrogas (*mdtA*) e resistência a antissépticos (*qacA*), em isolado obtido a partir da urina de uma égua (*Leptospira kirschneri* sorogupo Grippotyphosa UC5/2011) após aborto (JAEGER et al., 2019).

A avaliação da formação de biofilme por leptospiros associada à identificação de resistência é fundamental para o entendimento da patogênese e podem fornecer informações importantes para investigações posteriores que englobem pesquisas genômicas com o objetivo de elucidar mecanismos moleculares responsáveis pela resistência antimicrobiana. Dessa forma, objetivou-se avaliar a formação de biofilme *in vitro* de cepas autóctones e cepa de referência de *Leptospira interrogans*, bem como os perfis de susceptibilidade antimicrobiana na forma planctônica e em biofilme.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DE CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O presente trabalho foi desenvolvido no Hospital de Medicina Veterinária Renato de Medeiros Neto (HOSPMEV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Este estudo faz parte da abordagem disciplinar adotada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bacterioses (LABAC), UFBA. As cepas de *Leptospira* usadas neste estudo incluíram ***L. interrogans*, sg. Icterohaemorrhagiae, sv. Copenhageni**, (cepa Fiocruz L1 130) (L20) como controle positivo,

e quatro cepas autóctones de *Leptospira interrogans* (C20, C29, C51, C82) obtidas a partir de amostras de sangue e urina de cães naturalmente infectados, com quadro clínico agudo de leptospirose. As cepas foram mantidas em incubação e utilizadas com máximo de 15 passagens *in vitro* (5.9 passagens para L1 130, 0.14 passagens para C20 e C82 e 0.15 passagens para C29 e C51).

As cepas autóctones utilizadas no presente estudo foram caracterizadas por meio de abordagem sorológica e molecular, conforme descrito por Paz e colaboradores (2021). Brevemente, análise de BLAST das sequências 16S rRNA e *secY* amplificadas indicou 100% de homologia com a espécie *L. interrogans* nas cepas estudadas e, por meio da caracterização sorológica presuntiva, estes apresentaram semelhança com o sg. Icterohaemorrhagiae.

Todas as cepas estudadas e pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bacterioses estavam congeladas com crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5 % à -196 °C (NARDUCHE et al., 2016), em meio T80/40LH (JOHNSON; HARRIS, 1967). Uma alíquota de cada cepa foi descongelada à temperatura ambiente e todo o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de meio para o crescimento bacteriano. Para garantir a viabilidade e qualidade do experimento, as culturas foram avaliadas quanto i) ao crescimento da população bacteriana, devendo atingir concentrações próximas de 10^8 leptospiras/mL em aproximadamente sete dias; ii) movimentação ativa das bactérias, caracterizada por vigorosa rotação; iii) ausência de crescimento de microrganismos contaminantes; e iv) a presença ou não de auto-aglutinação.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Após o crescimento, uma curva com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/mL foi padronizada para todas as cepas com o objetivo de entender a dinâmica de crescimento e em que momento as estirpes atingem a fase exponencial. As culturas foram mantidas em estufa a 30°C e avaliadas a partir do segundo dia de incubação com contagens em câmara de Petroff-Hausser. O experimento foi realizado em triplicata e as cepas foram submetidas à avaliação a cada 24 horas, durante 16 dias de incubação, com visualização em microscópio de campo escuro em magnificação de 10x (HORNSBY; ALT; NALLLY, 2020).

5.3 DETERMINAÇÃO DO INÓCULO INICIAL PARA OS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos foram realizados com inóculo de suspensão bacteriana de 1×10^6 leptospiras/mL oriundo de uma cultura em fase exponencial média de crescimento (aproximadamente 10^8 leptospiras/mL) (THIBEAUX; KAINIU; GOARANT, 2020; THIBEAUX et al., 2020).

5.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi mensurada em placas de poliestireno com 96 poços de baixa evaporação, específicas para cultura de células e tecidos (Nest Biotechnology®, Jiangsu, China), conforme descrito por Thibeaux, Kainiu e Goarant (2020) e Thibeaux e colaboradores (2020), com algumas modificações. As cepas foram crescidas até a fase exponencial e contadas em câmara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific Company, PA, USA). Em seguida, as culturas foram diluídas a 1×10^6 leptospiras/mL. Posteriormente, 150 µL destas culturas foram dispensados no interior dos poços das placas de poliestireno. Para minimizar a evaporação, os poços da periferia não foram utilizados, mas preenchidos com água destilada estéril. Para ensaios semi-quantitativos, as placas foram incubadas a 30°C sob condições estáticas e avaliadas em momentos distintos (1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias). Foram utilizadas oito replicatas por cepa e os poços preenchidos somente com meio serviram como controle.

5.5 SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME CORADO POR CRISTAL VIOLETA

Após o período de incubação, as células planctônicas foram gentilmente aspiradas por pipetagem para remoção do sobrenadante. A fixação de biofilme foi realizada por meio da incubação em temperatura ambiente com 150 µL de paraformaldeído (PFA) diluído a 4% em PBS, por 30 minutos. Após este período, o PFA foi removido e os poços lavados duas vezes com 200 µL de PBS. As cepas foram avaliadas quanto a formação de biofilme por meio da adição de uma solução de 175 µL de cristal violeta a 0,1% por 10 minutos (O'TOOLE, 2011). O excesso de corante não aderido foi removido e os poços lavados duas vezes com 200 µL de PBS. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por algumas horas até secar (aproximadamente 3 horas). O cristal violeta remanescente nos poços foi solubilizado com a adição de 200 µL de ácido acético a 30%. Em seguida, 100 µL da solução foi transferida para uma nova placa para leitura. A semi-quantificação de biofilme foi realizada por meio de leitura

em espectrofotômetro de microplaca (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher, USA) em comprimento de onda de 570 nm (THIBEAUX et al., 2020).

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As cepas foram cultivadas como descrito na seção de formação de biofilme, com algumas modificações. Brevemente, para descrever a formação e arquitetura de biofilme ao longo do tempo, as culturas de *L. interrogans* foram observadas em quatro momentos distintos (1, 7, 14 e 21 dias de incubação). Inóculos de 1 mL de cultura em fase exponencial na concentração de 1×10^6 leptospiras/mL foram adicionados em placas de 24 poços, com fundo chato, específicas para cultura (JETBIOFIL[®], China), cada poço contendo uma lamínula de vidro estéril de 12x12 mm (Fisherbrand[®] -Fisher Scientific, Pittsburgh PA). Em cada ponto observacional, o sobrenadante foi removido, o biofilme lavado uma vez com PBS e posteriormente fixado com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 por 1 hora. Posteriormente, o biofilme foi lavado três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4, fixado com tetróxido de ósmio a 1% por 30 minutos e novamente lavado três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4. Após fixação, os biofilmes foram desidratados através de uma série de concentrações de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), dissecados, o carbono evaporado em equipamento CPD 030 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e posteriormente metalizados em ouro (25 nm). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JSM-6390LV (Jeol, Tóquio, Japão), com operação em 10Kv.

5.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMA PLANCTÔNICA

O ensaio de sensibilidade antimicrobiana foi realizado conforme descrito por Murray e Hospenthal (2004), com modificações. Foram empregados quatro antimicrobianos comumente utilizados na rotina clínica veterinária e recomendados para o tratamento de referência da leptospirose (amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e ciprofloxacina) (Sigma-Aldrich™ St. Louis, Missouri, USA). Os ensaios foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo que tem como objetivo a determinação da CIM (concentração inibitória mínima suficiente para inibir o crescimento bacteriano). Os resultados foram obtidos por meio de leituras das absorbâncias dos poços em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 570 e 600 nm e utilização do Alamar Blue (reagente que detecta o metabolismo de crescimento celular).

O controle positivo de cada cepa (poços com leptospiras e sem adição de antimicrobianos) e negativo (poços somente com meio de cultivo) foram estabelecidos. 100µl de meio T80/40LH foram adicionados aos poços das placas. Diluições seriadas de cada agente antimicrobiano foram preparadas com meio, resultando em concentrações finais variando de 0,02 a 1,600 µg/mL. Após este processo, alíquotas de 100 µl de cada cepa de *Leptospira* spp. em uma concentração de 1×10^6 células/mL foram preparadas e adicionadas aos seus respectivos poços, com exceção dos poços com controle negativo, aos quais adicionou-se 100 µL de meio. Em seguida, as placas com as culturas foram incubadas por 24 horas a 30°C sob exposição aos antibióticos. A viabilidade das leptospiras na forma planctônica foi verificada por meio da adição de 20 µL de AB em cada poço, onde foram incubadas por 90 minutos a 30°C. Após a exposição ao AB, o conteúdo foi transferido para uma nova placa de microtitulação para a leitura em espectrofotômetro. A densidade óptica das amostras foram lidas em comprimentos de onda de 570 e 600 nm, respectivamente. A alteração de cor azul para rosa foi indicativa de crescimento celular, enquanto permanência de cor azul inalterada correspondeu à ausência de metabolismo celular. Por meio das absorvâncias dos poços e sua inserção na fórmula disponibilizada pelo fabricante do AB, a CIM foi definida como a menor concentração da droga que resultou na redução em um valor igual ou inferior a 50% do AB, 90 minutos após a adição do reagente. O experimento foi realizado em triplicata.

As porcentagens de reduções do AB foram obtidas, utilizando a fórmula a seguir:

$$\frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

Onde: ϵ_{ox} = coeficiente de extinção molar do Alamar blue (azul) na forma oxidada, ϵ_{red} = coeficiente de extinção molar do Alamar blue (rosa) na forma reduzida, A = absorvância dos poços testes, A' = absorvância dos poços controle negativo, $\lambda_1 = 570\text{nm}$, e $\lambda_2 = 600\text{nm}$.

5.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOFILME

Para a realização do teste de sensibilidade antimicrobiana em biofilme, os controles positivos e negativos também foram estabelecidos. O ensaio foi realizado, conforme Murray e Hospenthal (2004) e Vinod Kumar e colaboradores (2016), com algumas modificações. Após completa formação de biofilme, com 21 dias de incubação o sobrenadante foi gentilmente aspirado e desprezado. Diluições seriadas dos antibióticos foram preparadas em meio

T80/40LH, com concentrações finais variando de 0,02 a 1,600 $\mu\text{g/mL}$, onde uma amostra de 150 μl de cada concentração antimicrobiana foi adicionada aos poços correspondentes. Em seguida, as placas com as culturas foram incubadas por 24 horas, a 30°C sob exposição aos antibióticos. Após a incubação, a viabilidade das bactérias em biofilme foi verificada por meio da adição de 20 μl de AB em cada poço, com posterior incubação por 6 horas a 30°C. A alteração de cor azul para rosa foi indicativa de crescimento celular, enquanto permanência de cor azul inalterada correspondeu à ausência de metabolismo celular.

Após a exposição ao AB, o conteúdo foi transferido para uma nova placa de microtitulação para a leitura no espectrofotômetro. A densidade óptica das amostras foi lida em comprimentos de onda de 570 e 600 nm, respectivamente. Por meio das absorvâncias dos poços e sua inserção na fórmula disponibilizada pelo fabricante do AB, a CIM foi definida como a menor concentração da droga que resultou na redução em um valor igual ou inferior a 50% do AB, após seis horas de exposição ao reagente. O experimento foi realizado em triplicata.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos com a realização das contagens foram analisados no software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Prism, EUA) por meio de análises descritivas, para a construção gráfica das curvas de crescimento. Todos os resultados estão representados em média e desvio padrão.

6 RESULTADOS

6.1 CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento para as cinco cepas estudadas pode ser observada na Figura 3. A espécie *L. interrogans*, Sg. *Icterohaemorrhagiae*, sv. *Copenhageni*, (cepa Fiocruz L1 130) (L20) exibiu uma breve fase lag de três dias, seguida de uma fase log com duração de quatro dias e fase estacionária com duração de três dias. A fase de declínio, iniciou-se após o 9º dia de incubação (Figura 3. A). O isolado C20 apresentou uma fase lag de quatro dias, seguida de fase log com duração de cinco dias, entretanto não foi possível identificar uma fase estacionária. Portanto, a fase de declínio iniciou logo após o pico, a partir do 9º dia de incubação (Figura 3. B). A cepa C29 exibiu uma fase lag com duração de quatro dias, seguida de uma fase log com longa duração de sete dias, entretanto também não foi possível identificar uma fase estacionária bem delimitada, culminando com a fase de declínio a partir do 11º dia de incubação (Figura 3. C). As cepas C51 e C82 apresentaram um padrão de crescimento similar, com fase lag de quatro dias, seguida de fase log com duração de cinco dias, passando a fase estacionária a qual teve três dias de duração e culminando na fase de declínio a partir do 11º dia de incubação (Figura 3. D e E). Com base nos dados obtidos, as cepas foram utilizadas para os experimentos na fase média de crescimento exponencial com 6 dias de incubação para L1 130 e C20, 8 dias para C29 e 7 dias para C51 e C82.

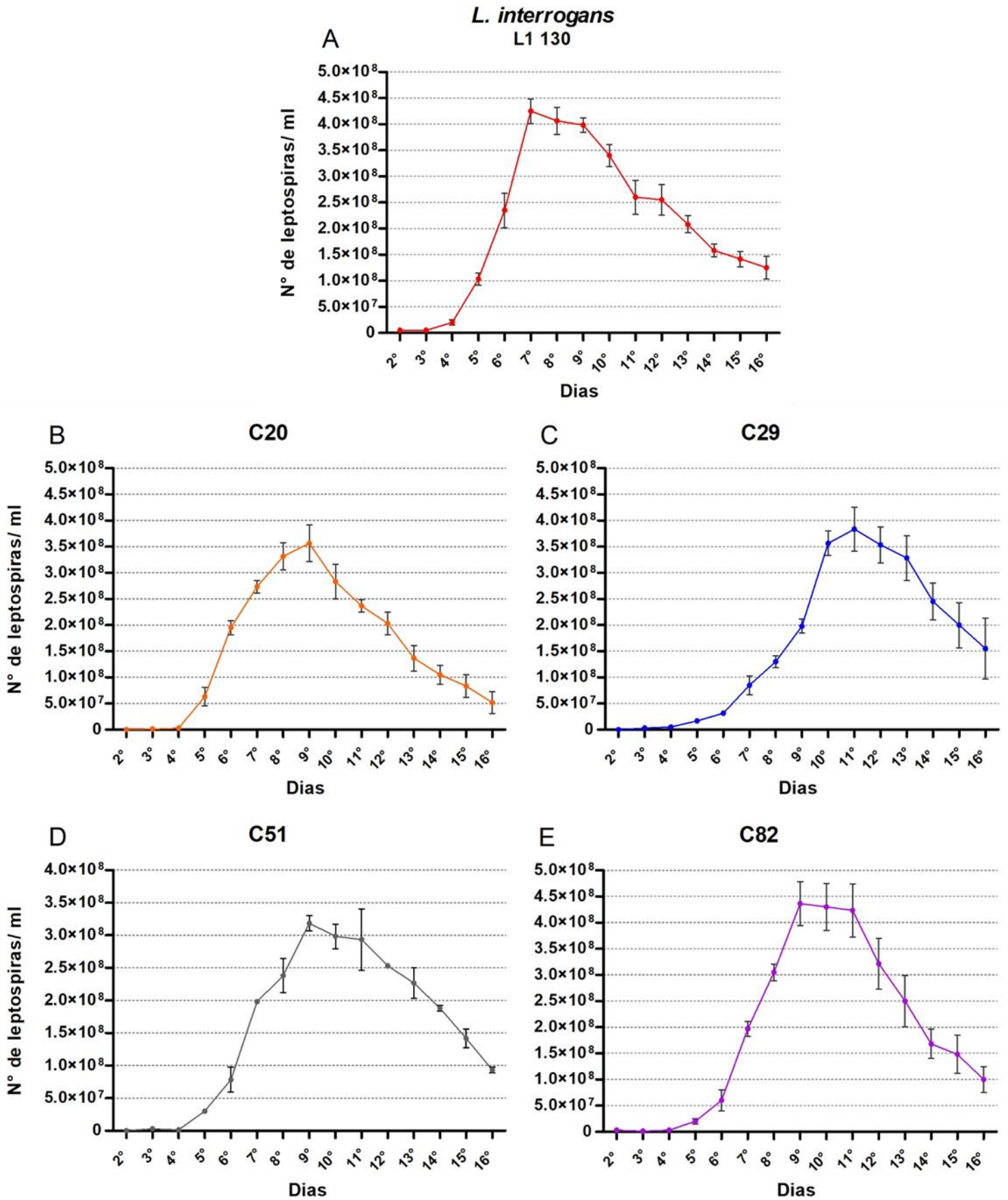


Figura 3 - Representação gráfica da curva de crescimento de *L. interrogans*, Sv. Copenhageni (cepa L1 130) e quatro cepas de *Leptospira interrogans*, Sg. Icterohaemorrhagiae (C20, C29, C51 e C82). As cepas foram incubadas com inoculo inicial de 10^4 leptospiiras/ ml, em meio T80/40LH, à 30°C . O experimento foi realizado em triplicata e as culturas foram contabilizadas em câmara de Petroff-Hausser, por meio de microscopia de campo escuro. Os resultados estão representados em média e desvio padrão.

6.2. AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Com base nos pontos observacionais ao longo do tempo, os biofilmes *in vitro* apresentaram comportamento semelhante entre a cepa de referência (*L. interrogans*, Sg. Icterohaemorrhagiae, sv. Copenhageni, cepa Fiocruz L1 130) e as cepas recentemente isoladas (C20, C29, C51 e C82). Dessa forma, todas as cepas deste estudo foram eficazes na formação de biofilme aderido a parede e no fundo dos poços até o 21º dia de incubação (Tabela 1).

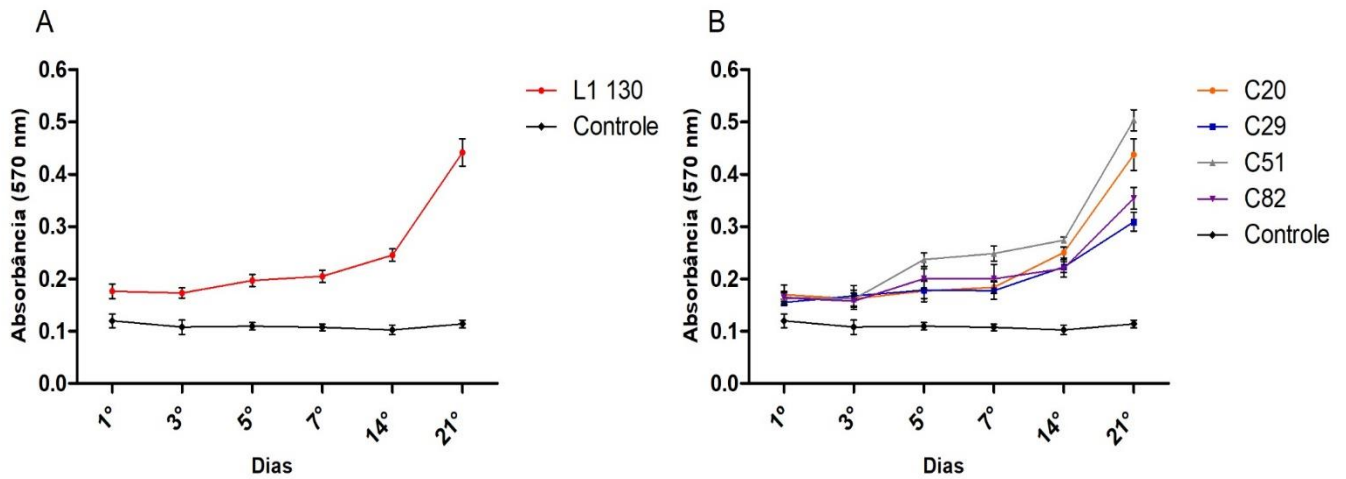
Tabela 1 – Formação de biofilme de *Leptospira interrogans in vitro* sobre condições estáticas em microplacas.

Nº das cepas	Espécie / Sorogrupo	Origem do isolamento	Origem
L1 130	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae		Humano
C20	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	Sangue	Cão
C29	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	Urina	Cão
C51	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	Sangue	Cão
C82	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	Sangue	Cão

6.3 SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME

Sob condições estáticas e em avaliação semi-quantitativa, tanto *L. interrogans*, Sg. Icterohaemorrhagiae – L1 130 (L20) como as cepas recentemente isoladas apresentaram valores semelhantes até o 3º dia de incubação (Figura 4 e Tabela 2). No 5º dia foi possível observar uma variação nas densidades ópticas, com mínima de 0,176 (C20) e máxima de 0,236 (C51). Aumento progressivo na biomassa de biofilmes foi observado a partir do 7º dia, atingindo densidades ópticas máximas no 21º dia de incubação (L1 130 DO = 0,441±0,02, C20 DO = 0,437±0,02, C29 DO = 0,309±0,01, C51 DO = 0,503±0,02, C82 DO = 0,353±0,02) (Figura 4 e Tabela 2). Comportamento semelhante foi observado em relação a formação de agregados de *Leptospira* corados por cristal violeta e aderidos ao fundo dos poços, com visualização inicial a partir do sétimo dia e expansão com a formação de agregados mais desenvolvidos até o 21º dia de incubação (Figura 5).

Figura 4 – Semiquantificação de biofilme *in vitro* de *Leptospira interrogans* avaliados por espectrofotometria.



(A) Caracterização da formação de biofilme *in vitro* de *L. interrogans*, Sg. Icterohaemorrhagiae, sv. Copenhageni, (cepa Fiocruz L1 130). (B) Caracterização da formação de biofilme *in vitro* de cepas autóctones.

Tabela 2 – Semiquantificação de biofilme *in vitro* de *Leptospira interrogans* avaliados por espectrofotometria.

Cepas	L1 130	C20	C29	C51	C82
Tempo em dias	Média DO ₅₇₀ (± DP)				
1	0,176 (±0,01)	0,170 (±0,01)	0,154 (±0,006)	0,164 (±0,009)	0,163 (±0,01)
3	0,173 (±0,009)	0,161 (±0,01)	0,167 (±0,02)	0,161 (±0,005)	0,157 (±0,01)
5	0,196 (±0,01)	0,176 (±0,02)	0,178 (±0,01)	0,236 (±0,01)	0,200 (±0,01)
7	0,204 (±0,01)	0,183 (±0,01)	0,177 (±0,01)	0,248 (±0,01)	0,199 (±0,03)
14	0,245 (±0,01)	0,250 (±0,01)	0,222 (±0,01)	0,274 (±0,005)	0,219 (±0,01)
21	0,441 (±0,02)	0,437 (±0,02)	0,309 (±0,01)	0,503 (±0,02)	0,353 (±0,02)

DO₅₇₀: Densidade óptica em 570 nm

DP: Desvio padrão

Figura 5 – Coloração de biofilme de *Leptospira interrogans*, por cristal violeta, aderido ao fundo dos poços em placas de microtitulação.



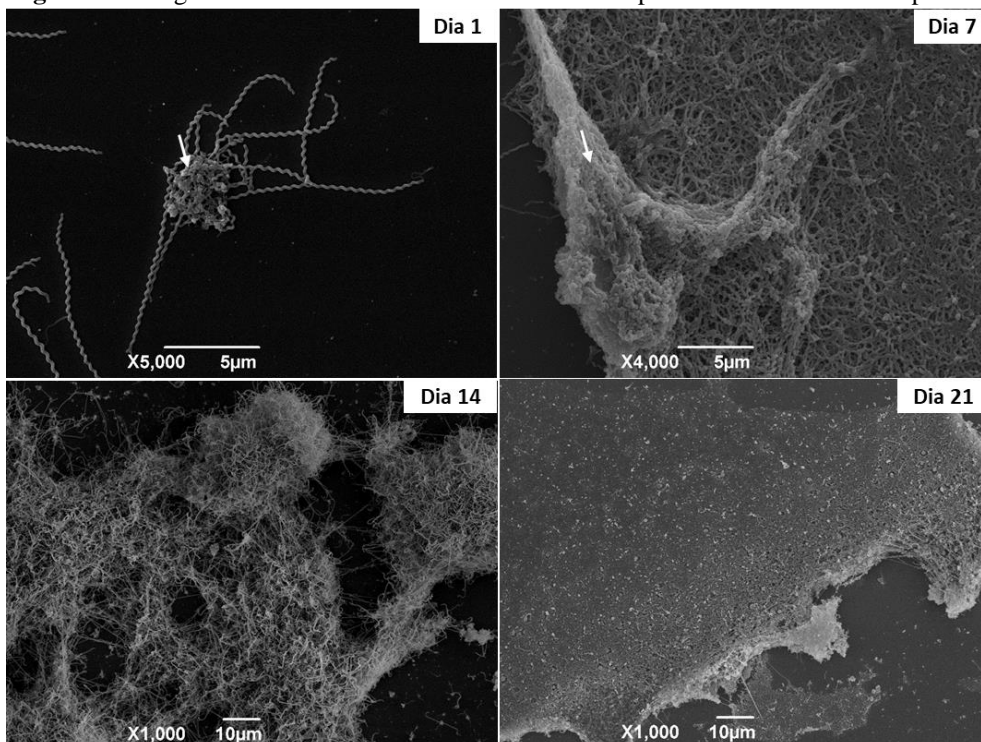
(A) Cultura no 7° dia, (B) 14° dia e (C) 21° dia de incubação.

6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Em diferentes pontos observacionais (1, 7, 14 e 21 dias) as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das cepas estudadas revelaram comportamento semelhante quanto a formação de biofilme (Figuras 6, 7 e 8). As imagens sugerem um processo de desenvolvimento de biofilme ao longo do tempo. Todas as cepas deste estudo apresentaram depósitos de matrix extracelular já visível no primeiro dia (Figuras 6, 7 e 8). Em sequência, no sétimo dia de incubação, foi possível observar a formação de biofilme maduro para todas as cepas, com uma rede intrínseca e interconectada de leptospiras aderidas à superfície e envolvidas por pontos com deposição de matriz exopolissacarídea amorfa (Figuras 6, 7 e 8).

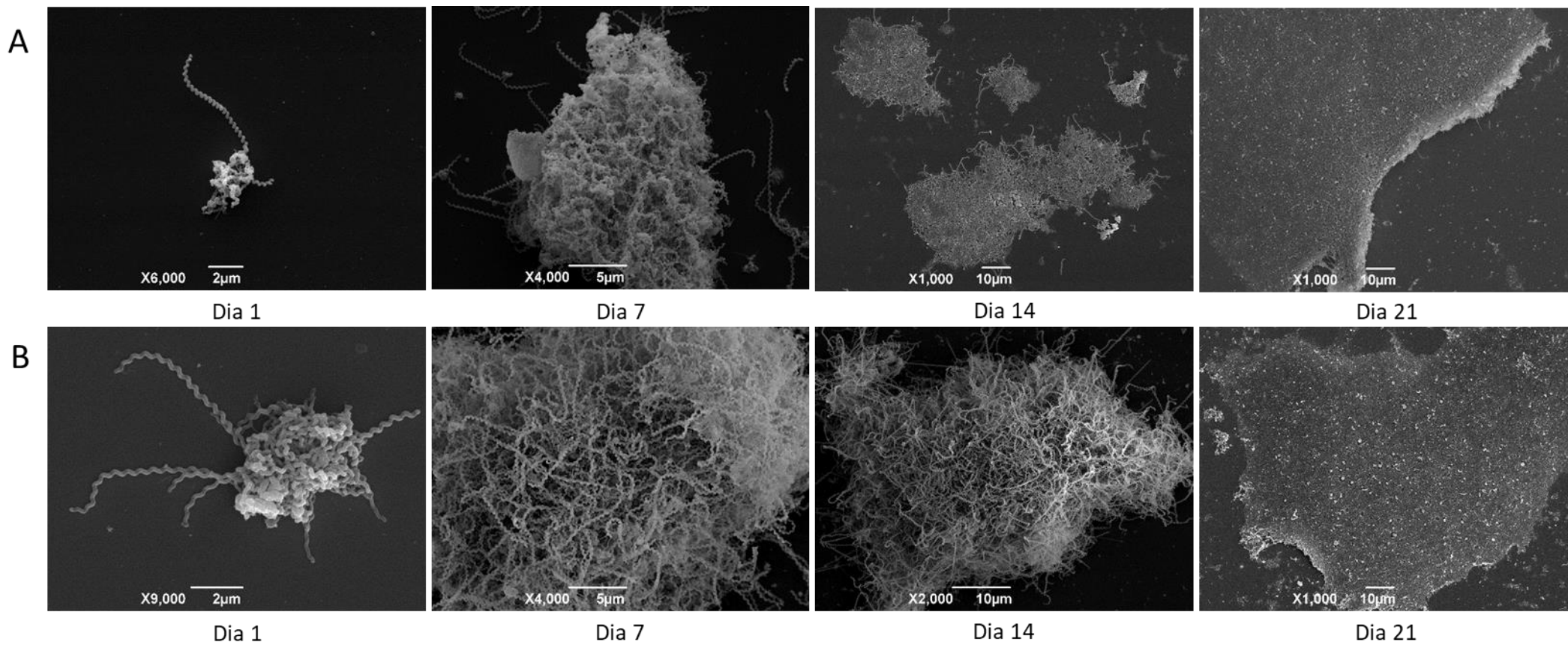
Após a primeira semana de incubação, mais especificamente nos dias 14 e 21, os biofilmes apresentaram-se como estruturas morfolologicamente mais desenvolvidas e coesas, mantendo as características de um biofilme maduro, entretanto com maior deposição de matriz extracelular (Figuras 6, 7 e 8). Notadamente, no 21º dia de incubação as imagens em alta magnificação de MEV, mostraram áreas com evidente deposição de matriz extracelular e estruturas semelhantes a canais que se interconectam (Figuras 9 e 10). Também pode ser observada a presença de diversos filamentos ramificados de matriz extracelular formados em vários pontos e circundando estes canais (Figuras 9 e 10).

Figura 6 – Imagens de MEV demonstrando biofilme de cepa C20 em diferentes tempos de incubação



As setas brancas indicam regiões com deposição de matriz extracelular

Figura 7 - Imagens de MEV demonstrando biofilmes de *Leptospira interrogans* (cepa L1 130 e C29) em diferentes tempos de incubação.



(A) Biofilmes de *L. interrogans*, Sg. Icterohaemorrhagiae, cepa L1 130 (L20). (B) Biofilmes de cepa C29.

Figura 8- Imagens de MEV demonstrando biofilmes de *Leptospira interrogans* (cepa C51 e C82) em diferentes tempos de incubação.

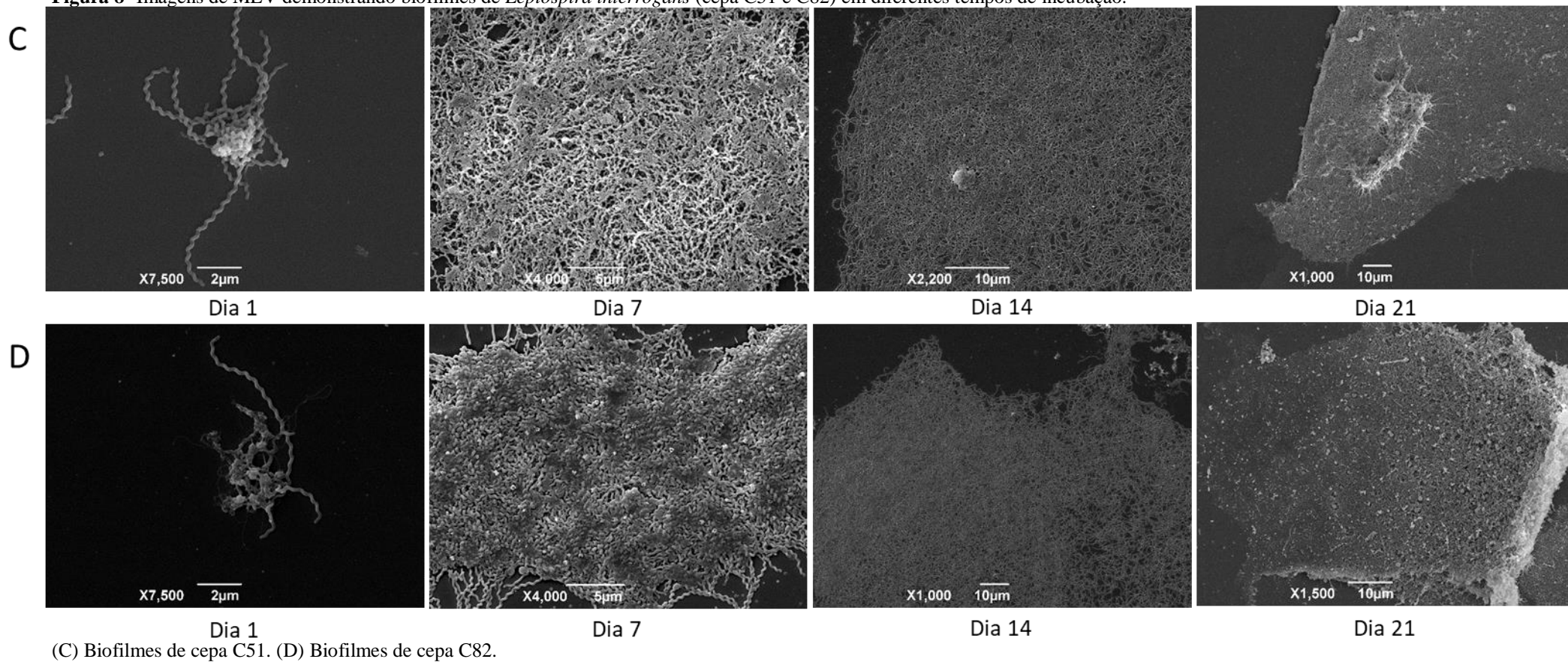
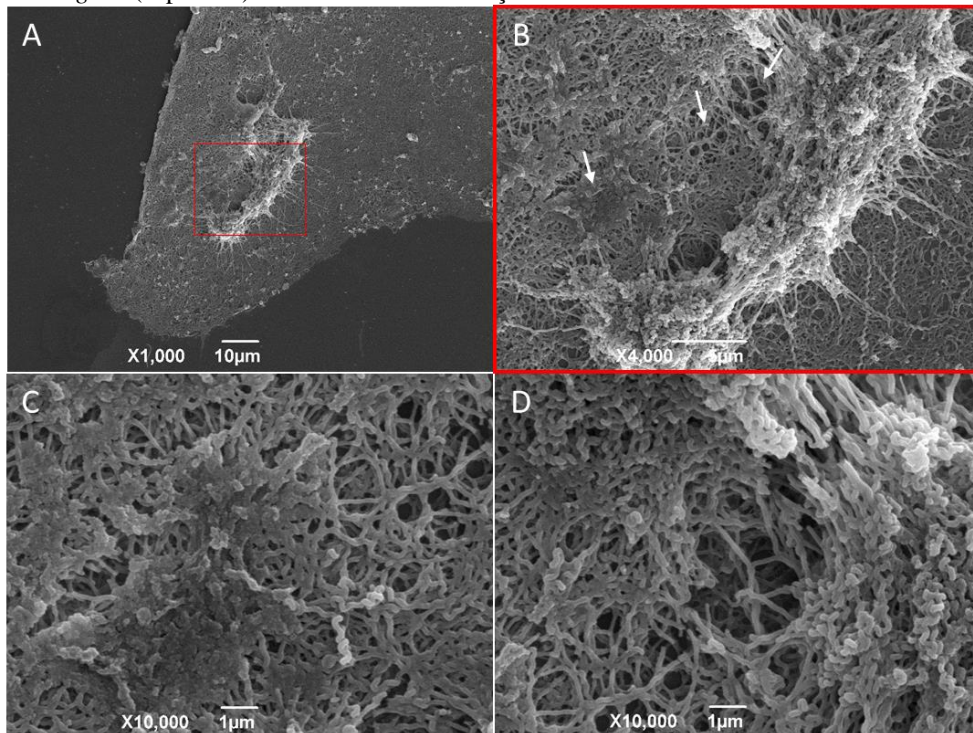
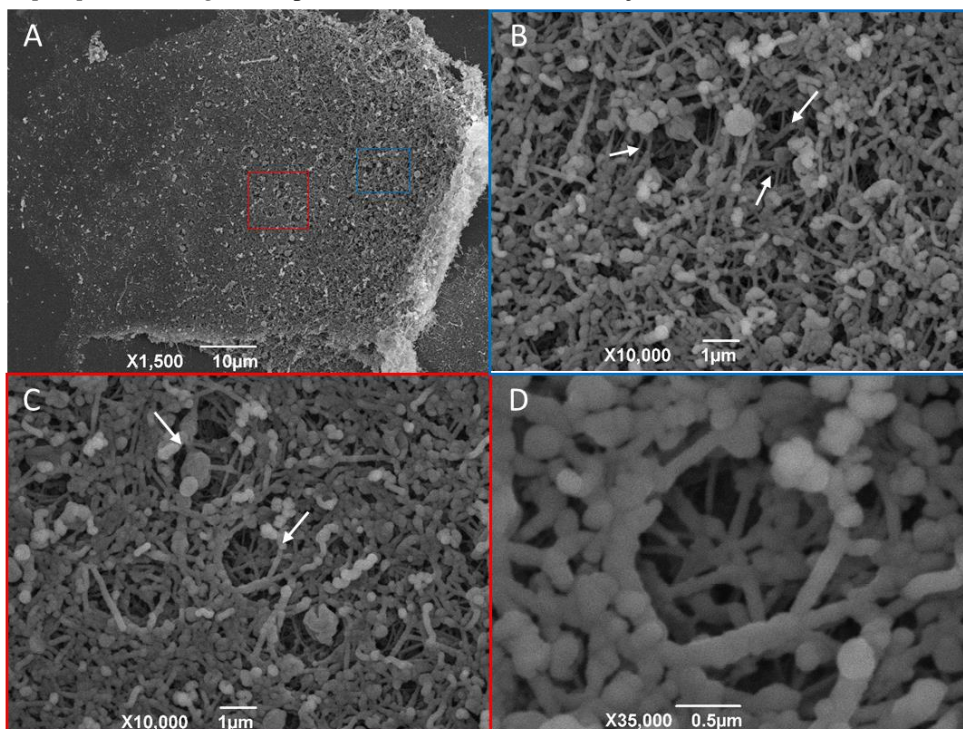


Figura 9 – Imagens de MEV demonstrando a organização e arquitetura de biofilme de *Leptospira interrogans* (cepa C51) com 21 dias de incubação.



(A) Biofilme de cepa C51. (B) Setas brancas indicando áreas com deposição de matriz exopolissacarídea amorfa e canais interconectados. (C) e (D) Imagens em maior magnificação demonstrando as regiões e estruturas supracitadas.

Figura 10 - Imagens de MEV demonstrando a organização e arquitetura de biofilme de *Leptospira interrogans* (cepa C82) com 21 dias de incubação.



(A) Biofilme de cepa C82. (B) Setas brancas indicando estruturas ramificadas de matriz extracelular. (C) e (D) Imagens em maior magnificação demonstrando os canais interconectados e filamentos ramificadas envolvendo tais estruturas.

6.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMA PLANCTÔNICA E BIOFILME

O teste de sensibilidade antimicrobiana da forma planctônica, demonstrou susceptibilidade das cepas testadas para todas as drogas, incluindo para os derivados de penicilina (amoxicilina e ampicilina), com CIMs iguais ou abaixo do limite inferior de detecção ($CIM_{90} \leq 0,02 \mu\text{g/mL}$). As CIMs para doxiciclina foram discretamente superiores e variaram de $\leq 0,02$ a $0,39 \mu\text{g/mL}$, representando uma CIM_{90} de $0,2 \mu\text{g/mL}$. Quanto à ciprofloxacina (CIM_{90} de $0,1 \mu\text{g/mL}$), também observou-se discreto aumento nas CIMs para todas as cepas estudadas, com concentrações variando de $0,1$ a $0,39 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

O teste de sensibilidade antimicrobiana em biofilme demonstrou resistência das cepas testadas para os derivados de penicilina (amoxicilina e ampicilina), com CIM_{90} de $1,600 \mu\text{g/mL}$ e $800 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. As CIMs para doxiciclina variaram de $1,600$ a $>1,600 \mu\text{g/mL}$, com $CIM_{90} >1,600 \mu\text{g/mL}$. Para ciprofloxacina, foi observado comportamento semelhante (CIM_{90} de $>1,600 \mu\text{g/mL}$), com variações nas CIMs entre $1,600$ a $>1,600 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Ressalta-se, que dentro do intervalo de concentrações antimicrobianas do nosso estudo e com base no número de diluições seriadas, os biofilmes das cepas foram de 13 a 16 vezes mais resistentes do que suas formas planctônicas. Nos casos onde a CIM foi superior a última diluição utilizada neste estudo ($1,600 \mu\text{g/mL}$), o perfil mínimo de resistência de biofilme em comparação à forma planctônica, pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição de CIMs para amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e ciprofloxacina entre cepa de referência e cepas autóctones de *Leptospira interrogans*, na forma planctônica e biofilme

Nº das cepas	Espécie/Sorogrupo	Amoxicilina			Ampicilina			Doxiciclina			Ciprofloxacina		
		CIM (µg/mL)											
		Planct	Biofilme	Resist.	Planct	Biofilme	Resist.	Planct	Biofilme	Resist.	Planct	Biofilme	Resist.
L1 130	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	0,2	>1,600	>13	0,1	>1,600	>14
C20	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	0,2	1,600	13	0,39	>1,600	>12
C29	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	≤ 0,02	1,600	16	0,1	1,600	14
C51	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	0,39	>1,600	>12	0,2	>1,600	>13
C82	<i>L. interrogans</i> / Icterohaemorrhagiae	≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	0,39	>1,600	>12	0,1	1,600	14
CIM₉₀		≤ 0,02	1,600	16	≤ 0,02	800	15	0,2	>1,600	>13	0,1	>1,600	>14

CIM – Concentração inibitória mínima

Planct – Forma planctônica

Resist – Resistência de biofilme em comparação a forma planctônica

Em casos onde a CIM foi superior a 1,600, a contagem para resistência foi feita até o respectivo valor, adicionada ao símbolo de “ > ”

Os resultados de susceptibilidade cumulativa para todos as cepas são expressos como CIM₉₀

7 DISCUSSÃO

Juntamente com a sua capacidade de penetrar no tecido do hospedeiro, as leptospiros se adaptam a diversas matrizes ambientais, como coleções de água, rios, solo e superfícies abióticas (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018; TRUEBA et al., 2004); a habilidade de formar biofilmes é considerada um dos principais mecanismos facilitadores dessas adaptações (BRIHUEGA et al., 2012). No biofilme, as células aderem a uma superfície e formam comunidades, dentro das quais se multiplicam por meio de uma complexa rede de comunicação intercelular, permitindo ajustes rápidos nas adaptações de resposta às mudanças no organismo hospedeiro e no ambiente (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009; RISTOW et al., 2008).

Nossas investigações mostraram que todas as cepas formaram biofilme até o 21º dia de incubação. Como documentado por Thibeaux e colaboradores (2020), a visualização de biofilme maduro em nosso estudo, foi possível aos sete dias de incubação, e, após a primeira semana a progressão do crescimento para biomassas mais bem estabelecidas, morfológicamente, foi consistente com o aumento no período de incubação. O crescimento bacteriano e a consequente formação de biofilme são responsáveis pelo aumento na intensidade da coloração do cristal violeta e na densidade óptica das cepas (THIBEAUX; KAINIU; GOARANT, 2020).

A literatura reporta que microrganismos móveis geralmente agregam-se às paredes e/ou fundo dos poços, enquanto bactérias imóveis geralmente aderem apenas no fundo dos poços (O'TOOLE, 2011). As cepas deste estudo formaram biofilme tanto na parede como no fundo dos poços. Este resultado pode ser justificado pelas características metabólicas de respiração aeróbica estrita e motilidade inerentes ao gênero *Leptospira*, corroborando os resultados reportados por Ristow e colaboradores (2008) que também identificaram o mesmo comportamento na formação de biofilme *in vitro* de leptospiros saprófitas e patogênicas em placas de poliestireno. Resultado semelhante foi observado por Vinod Kumar e colaboradores (2015) que avaliaram a formação de biofilme *in vitro* de *Leptospira* spp. associada à bactéria ambiental *Azospirillum brasilense*.

Em nosso estudo, imagens de microscopia eletrônica de varredura destacaram características estruturais importantes em biofilmes. As áreas com leptospiros fortemente interligadas e embebidas por material amorfo, são estruturalmente compatíveis com deposições de componentes da matriz, o exopolissacarídeo. Estes componentes, fornecem a estabilidade mecânica de biofilmes, mediam sua adesão às superfícies e formam uma rede polimérica

coesiva e tridimensional que interconecta e imobiliza transitoriamente as células do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Após três semanas de incubação, as imagens de MEV evidenciaram a presença de estruturas que se assemelham a canais interconectados e filamentos ramificados de matriz extracelular. Estas estruturas morfológicas conferem o transporte de nutrientes, gases e outros metabólitos, necessários para sobrevivência bacteriana (FLEMING; WINGENDER, 2010; BERLANGA; GUERRERO, 2016). Desta forma, com base nas nossas imagens e como relatado por Thibeaux et al., (2020a), o aspecto arquitetônico dos canais interconectados e filamentos assemelham-se a um sistema circulatório que favorece o crescimento da comunidade bacteriana em biofilmes, garantindo a entrada de nutrientes e oxigênio e a saída de produtos tóxicos e residuais (BERLANGA; GUERRERO, 2016).

Biofilmes são descritos como fatores de colonização e virulência, participando da patogênese de diversas doenças infecciosas (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009), incluindo a leptospirose (SANTOS et al., 2021). Alguns fatores como a expressão genotípica e fenotípica de cada cepa são determinantes para a produção de biofilme bacteriano (VUOTTO et al., 2017). Nossos resultados estão de acordo com Thibeaux et al. (2020a), que ao observarem a formação de biofilmes *in vitro* em uma cepa selvagem de *Leptospira interrogans*, sv. Manilae, também descreveram crescimento progressivo de biofilmes corados por cristal violeta e crescidos em placas de poliestireno. No entanto, o presente estudo é o primeiro a documentar a formação e desenvolvimento de biofilme em cepas de *Leptospira interrogans* obtidas a partir de amostras de cães naturalmente infectados.

Considerando o cenário local de onde foram isoladas as cepas estudadas (área endêmica com intensa circulação de leptospiros na população canina), o patógeno e suas interações com o hospedeiro, e a capacidade de formação de biofilme *in vitro*, sugerimos que essas mesmas cepas podem ser capazes de formar biofilme nos tecidos dos cães. Embora as condições *in vitro* e *in vivo* possam influenciar os padrões de expressão genotípica e fenotípica, a formação de biofilme foi documentada para todas as cepas estudadas, enfatizando a possibilidade desta hipótese ser considerada.

No teste de sensibilidade antimicrobiana da forma planctônica, as cepas deste estudo foram sensíveis à amoxicilina e ampicilina. Pesquisas prévias no Brasil, também identificaram reduzidas CIMs para ambas as drogas, avaliando isolados de *L. interrogans*, sv. Pomona obtidos de suínos (MIRAGLIA et al., 2015) e *L. interrogans*, sg. Icterohaemorrhagiae, sv. Copenhageni obtidos de humanos, ratos, cães e bovinos (MIRAGLIA et al., 2013). Alguns estudos utilizando isolados autóctones de *Leptospira* spp. também reportaram susceptibilidade das cepas frente à

penicilina e seus derivados (amoxicilina e ampicilina) (BENACER et al., 2017; CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM, 2018).

Em contraste ao nosso estudo, Suepaul e colaboradores (2015) em Trinidad, reportaram resistência dos isolados de cães e ratos à amoxicilina, com elevados valores de CIM e CBM. Conforme os autores, este comportamento pode ocorrer devido ao fato da droga ser amplamente utilizada, muitas vezes sem prescrição médica, em Trinidad. Sua utilização de forma não regulamentada e exacerbada no tratamento da leptospirose podem ter colaborado para o surgimento de resistência nos isolados da região, admitindo-se que esse resultado seja consequência de uma possível pressão local da droga. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a susceptibilidade das cepas a este antimicrobiano pode ser atribuída ao fato da amoxicilina não ser comumente utilizada no tratamento da leptospirose em nossa região.

Nossos isolados locais também foram sensíveis a ampicilina, que configura como uma das opções para terapêutica na leptospirose (SCHULLER et al., 2015). Este resultado é compatível com outros relatos, visto que esta droga mostrou ser uma opção potencial em ensaios *in vitro* (BENACER et al., 2017; CHAKRABORTY et al., 2010). Um estudo *in vitro*, avaliando os efeitos dos agentes antimicrobianos na arquitetura celular, verificou lise completa de células com perda da integridade na membrana interna e externa, após 24 horas de exposição à ampicilina (CHAKRABORTY et al., 2011). Estes achados na microscopia eletrônica elucidam o potencial efeito bactericida da ampicilina, que atua através da inibição da síntese de peptideoglicano (CHAKRABORTY et al., 2011).

A doxiciclina mostra-se como uma droga eficaz em terapia clínica e estudos *in vitro* (SUEPAUL et al., 2015; CHAKRABORTY et al., 2010). Esta tetraciclina, junto aos derivados de penicilina, é reconhecida como droga de eleição para o tratamento da leptospirose (SCHULLER et al., 2015). Conforme os nossos resultados e relatos em estudos anteriores (BENACER et al., 2017; LIGEON; DELORY; PICARDEAU, 2017; MURRAY; HOSPENTAL, 2004), apesar do discreto aumento nas concentrações inibitórias para doxiciclina em nosso estudo, estas são consideradas baixas e ainda sugerem tal droga como eficaz para produzir inibição ou um efeito bactericida em cepas de *Leptospira* (BENACER et al., 2017).

Em relação a fluoroquinolona (ciprofloxacina), nossos resultados se assemelham a observações *in vitro*, que verificaram susceptibilidade em isolados obtidos a partir de ratos e humanos, indicando esta droga como alternativa ao tratamento (CHAKRABORTY et al., 2010; RESSNER et al., 2008). Em contraste, *L. interrogans*, sv. Pomona (isolado de suíno no Brasil) (MIRAGLIA et al., 2015) e *L. interrogans*, sg Icterohaemorrhagiae, sv

Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (humanos, ratos, cães e bovinos) (MIRAGLIA et al., 2013), demonstraram perfil de resistência para ciprofloxacina com valores de CIMs superiores ao esperado para esta classe antimicrobiana.

Os biofilmes das cepas deste estudo foram consideravelmente mais resistentes, quando comparados a sua forma planctônica, apresentando concentrações antimicrobianas 13 a 16 vezes maiores do que as requeridas para inibição do crescimento na forma planctônica. Vinod Kumar e colaboradores (2016) ao comparar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de biofilme e forma planctônica em cepas de *Leptospira* spp., também identificaram concentrações antimicrobianas superiores para biofilme, que variaram de 800 a 1,600 µg/mL, para drogas como ampicilina, tetraciclina, doxiciclina e penicilina G. Adicionalmente, em biofilmes associados de *Leptospira interrogans* e *Azospirillum brasilense*, as concentrações inibitórias para penicilina G, ampicilina e tetraciclina foram maiores do que para leptospiros na forma planctônica (Vinod Kumar et al., 2015).

Ainda não há um consenso definido, no que tange a interpretação dos resultados envolvendo a microdiluição em caldo com *Leptospira* spp., visto que pontos de cortes exatos não foram estabelecidos para definição de um perfil de resistência ou susceptibilidade. Isto torna a interpretação dos dados variável, evidenciando a necessidade de mais estudos para melhor padronização. Portanto, como algumas cepas na forma de biofilme apresentaram CIMs superiores à diluição máxima utilizada neste estudo (1.600ug/ml), sugerimos ampliar as concentrações de antimicrobianos em investigações futuras, para definir com maior precisão as CIMs das drogas avaliadas.

As bactérias em biofilmes apresentam uma série de características que dificultam sua erradicação (LIU et al., 2016). Elas são fenotipicamente distintas de suas formas planctônicas, principalmente no que diz respeito às taxas de crescimento e expressão gênica (DONLAN, 2001). Estudos experimentais relatam que células que se destacam de biofilmes tem uma maior associação com citotoxicidade e mortalidade do que as suas formas planctônicas (HOIBY et al., 2010). A frequência de mutação em bactérias que crescem nestas condições é significativamente maior quando comparada ao seu crescimento planctônico (DRIFFIELD et al., 2008). A formação de biofilme fornece ambiente ideal para transmissão horizontal de genes de resistência e comunicação química entre as células, permitindo-as coordenarem sua atividade de crescimento e se agruparem em comunidades (LIU et al., 2016). Essas condições fisiológicas justificam o motivo pelo qual as bactérias que crescem em biofilme facilmente se tornam multirresistentes por meio de mecanismos tradicionais de resistência contra antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (HOIBY et al., 2010).

As células bacterianas em biofilmes podem produzir simultaneamente enzimas que degradam os antibióticos e alteram suas moléculas alvo, diminuindo conseqüentemente a sua afinidade pelos antibióticos. Ressalta-se que já foi documentado que as cepas bacterianas em biofilme tendem a aumentar a expressão de seus sistemas de efluxo que apresentam ampla gama de substratos (HOIBY et al., 2010). Outros fatores, como a arquitetura, organização e produção de substância polimérica extracelular, também desempenham papel importante no aumento da resistência contra agentes antimicrobianos (FLEMING; WINGENDER, 2010). Todos esses fatores podem justificar os nossos achados, enfatizando a importância da formação de biofilme por leptospiros, na resistência antimicrobiana.

A documentação da formação de biofilme em cepas obtidas de cães naturalmente infectados em uma região endêmica para leptospirose, tem grande relevância no âmbito da saúde pública, dada a estreita relação entre cães e humanos. Biofilmes têm demonstrado influenciar a sobrevivência ambiental de *L. interrogans* (VINOD KUMAR et al., 2016b; THIBEAUX et al., 2017), patogênese e manutenção da infecção em hospedeiros reservatórios (SANTOS et al., 2021). Portanto, sugerimos que o manejo da leptospirose precisa ser acompanhado de maiores esforços na prevenção, diagnóstico, tratamento assertivo e controle com o objetivo de diminuir a incidência da infecção em áreas endêmicas (LAU et al., 2010; PICARDEAU, 2015). Ressaltamos também a necessidade de mais estudos com novas estratégias, que incluam a seleção e/ou identificação de agentes com efeito antibacteriano e antibiofilme (neutralização e disrupção de biomassa) para avaliação terapêutica em animais infectados por *Leptospira* spp. e com a condição de portadores crônicos.

8 CONCLUSÃO

As cepas deste estudo formaram biofilme *in vitro* e apresentaram um aumento na resistência antimicrobiana nestas condições, quando comparadas a sua forma planctônica. Tais cepas foram obtidas de cães naturalmente infectados que podem atuar como reservatórios e sentinelas para infecções humanas. Portanto, a potencial resistência antimicrobiana em isolados oriundos de uma espécie próxima ao homem, indica urgência no controle da doença nestes hospedeiros, visto que esses animais podem atuar como carreadores crônicos de *Leptospira interrogans* disseminando o agente no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Antimicrobial Suceptibilities. **Leptospira and leptospirosis**, p. 86, 2015.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–96, 27 jan. 2010.
- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.
- AHMAD, S. N; SHAH, S; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p.195200, 2005.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F. M.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v.18, n. 9, p. e7093, 2009.
- ALLEN, A. E.; BUCKLEY, G. J.; SCHAEER, M. Successful treatment of severe hypokalemia in a dog with acute kidney injury caused by leptospirosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 26, n. 6, p. 837-843, 2016.
- ALMEIDA, D. S.; PAZ, L.N.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, D. N.; RISTOW, P.; HAMOND, C.; COSTA, F.; PORTELA, R.W.; ESTRELA-LIMA, A.; PINNA, M. H. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217391, 2019.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Microbial Transmission**, p. 117-137, 2019.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis—Do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 19–24, 5 out. 2006.
- APARNY, M. S. D.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brasilian Journal of Infectious Disease**, v. 12, n.6, p. 526-530, 2008.
- ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. a.; MCBRIDE, A. J. a; KO, A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, p. 176–180, 2008.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BALES, P. M.; RENKE, E. M.; MAY, S. L.; SHEN, Y.; NELSON, D. C. Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. **PloS one**, v. 8, n. 6, 2013.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.
- BENACER, D.; ZAIN, S. N. M.; OOI, P. T.; THONG, K. L. Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* spp. isolated from environmental, human and animal sources in Malaysia. **Indian journal of medical microbiology**, v. 35, n. 1, p. 124-128, 2017.

BERLANGA, Mercedes; GUERRERO, Ricardo. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2016.

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.; PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–71, dez. 2003.

BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T.; BLAZIUS, E. M. C. G.; SILVA, O. S. Occurrence of *Leptospira* spp. soropositive stray dogs in Itapema, Santa Catarina, Brazil. **Cadernos de Saúde pública**, v. 21, n. 6, p. 1952-1956, 2005.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 4061–4067, 2014.

BRIHUEGA, B.; SAMARTINO, L.; AUTERI, C.; VENZANO, A.; CAIMI, K. In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 44, n. 3, p. 138-143, 2012.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIES, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; BURCH, B. P.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. L.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. 1. ed. Berlin: Heidelberg, 2015. p. 21–41.

CARVALHO, S. M.; GONÇALVES, L. M. F.; MACEDO, N. A.; GOTO, H.; SILVA, S. M. M. S.; MINEIRO, A. L. B. B.; KANASHIRO, E, H, Y.; COSTA, F. A. L. Infecção por leptospirosas em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 637-642, 2011.

CASANOVAS-MASSANA, A.; PEDRA, G. G.; WUNDER, E. A.; DIGGLE, P. J.; BEGON, M.; KO, A. I. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 13, 2018.

CERI, H; OLSON, M. E.; TURNER, R. J. Needed, new paradigms in antibiotic development. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 8, p. 1233-1237, 2010.

CHAKRABORTY, A.; MIYAHARA, S.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5403-5405, 2010.

CHAKRABORTY, A. et al. Electron microscopic study of the effects of antimicrobial agents on the cellular architecture of *Leptospira*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, n. 6, p. 872-875, 2011.

- CHAKRABORTY, A.; MIYAHARA, S.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; SAITO, M.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S.-I. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, jul. 2011.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.
- CHRISTENSEN, B. E, CHARACKLIS, W. G. **Physical and chemical properties of biofilms**. In: Characklis WG, Marshall KC, ed. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1990. p. 93-130.
- CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Reduced susceptibility in leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2018.
- COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 17 set. 2015.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.
- DECLERCK, P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 3, p. 557-566, 2010.
- DAROUICHE, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1422-1429, 2004.
- DE BRITO, T.; MENZES, L. F.; LIMA, D. M. C.; LOURENÇO, S.; SILVA, A. M. G.; ALVES, V. A. F. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. **Virchows Archiv**, v. 448, n. 5, p. 576–583, 16 maio 2006.
- DELLAGOSTIN, O.; GRASSMANN, A.; RIZZI, C.; SCHUCH, R.; JORGE, S.; OLIVEIRA, T.; MCBRIDE, A.; HARTWIG, D. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 158, 14 jan. 2017.
- DEL POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204-209, 2007.
- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of anti-infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.
- DIAS, C. S. et al. Kidney Injury Molecule-1 in the detection of early kidney injury in dogs with leptospirosis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 76, p. 101637, 2021.
- DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical infectious diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DRIFFIELD, K.; MILLER, K.; BOSTOCK, A. J.; NEILL, A. J.; CHOPRA, I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1053-1056, 2008.

FAINE, S. *Leptospira and Leptospirosis*. 2^o ed. Melbourne, Australia:MedSci, 1999.

FERRI, M.; RANUCCI, E.; ROMAGNOLI, P.; GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017.

FLEMMING, H. C; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FONZAR, U. J. V.; LANGONI, H. Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the city of Maringá, state of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 100–105, fev. 2012.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Diagnostic microbiology**. 12^o ed. St. Louis, USA: Mosby Elsevier, 2007.

GALLAHER, T. K.; WU, S.; WEBSTER, P.; AGUILERA, R. Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus influenzae*. **BMC microbiology**, v. 6, n. 1, p. 65, 2006.

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MULLER, W.; GREENE, C.; HARTMANN, K. Canine leptospirosis infections—clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 324-328, 2007.

GLOAG, E. S. et al. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. **Biofilm**, v. 2, p. 100017, 2020.

GOLDSTEIN, R. E. Canine Leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1091–1101, nov. 2010.

GOLDSTEIN, R. E.; LIN, R. C.; LANGSTON, C. E.; SCRIVANI, P. V.; ERB, H. N.; BARR, S. C. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 489–494, 2006.

GREENLEE, J. J. et al. Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1816–1822, 2005.

GRIFFITH, M. E.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 6, p. 533-537, 2006.

GRIFFITH, Matthew E. et al. Efficacy of fluoroquinolones against *Leptospira interrogans* in a hamster model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2615-2617, 2007.

GUTIERREZ, L.; MENDONZA, J.; RANGEL, A. B.; TAPIA, G.; BERNAD, M. J.; SUMANO, H. Outpatient Clinical Trial in Dogs With Leptospirosis Treated With Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate (ENRO-C). **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 360, 2019.

- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–14, 2010.
- HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. **Infection and immunity**, v. 59, n. 3, p. 1131-1140, 1991.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, 2009.
- HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 81–85, 13 mar. 2014.
- HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and reemerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical microbiology and infection*, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.
- HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E.; WARD, R. J.; SCHARTTNER, M.; GOMEZ, R. M.; HO, P. L. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 4, p. 1341–1347, ago. 2005.
- HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
- HOOPER, D. C. Quinolones. In: **Practice of Infections Disease**. 6. ed. New York (New York): Churchill Livingstone editora, 2005, p. 451-467.
- HORNSBY, R. L.; ALT, D. P.; NALLY, J. E. Isolation and propagation of leptospire at 37 C directly from the mammalian host. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2646-2648, 2003.
- IRAOLA, G.; SPANGENBERG, L.; BASTOS, B. L.; GRANA, M.; VASCONCELOS, L.; ALMEIDA, A.; GREIF, G.; ROBELLO, C.; RISTOW, P.; NAYA, H. Transcriptome sequencing reveals wide expression reprogramming of basal and unknown genes in *Leptospira biflexa* biofilms. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. e00042-16, 2016.
- JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y. D. N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 97-121, 2010.
- JAEGER, L. H.; MORENO, L. Z.; KREMER, F. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; MORENO, A. M.; LILENBAUM, W. Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira*

- kirschneri serogroup Grippotyphosa UC5/2011, a strain isolated after mare abortion: Implications for genital animal leptospirosis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 64, p. 7-9, 2019.
- JAEGER, L. H.; PESTANA, C. P.; CARVALHO-COSTA, F. A.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Characterization of the clonal subpopulation Fiocruz L1-130 of *Leptospira interrogans* in rats and dogs from Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 9, p. 1361-1367, 2018.
- JOHN, G. T.; DONALE, C. L. **Biofilms: architects of disease**. In: CONNIE R.M., DONALD C.L., GEORGE M. 3. ed: Saunders editors. Textbook of diagnostic microbiology, 2007, p. 884-95.
- JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire I. Growth at low temperatures. **Journal of bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.
- JUVET, F. et al. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. **Veterinary Record-English Edition**, v. 168, n. 21, p. 564, 2011.
- KING, A. M.; BARTPHO, T.; SERMSWAN, R. W.; BULACH, D. M.; ESHGHI, A.; PICARDEAU, M.; ADLER, B.; MURRAY, G. L. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression. **Infection and immunity**, v. 81, n. 8, p. 2768-2776, 2013.
- KOHN, B.; STEINICKE, K.; ARNDT, G.; GRUBER, A. D.; GUERRA, B.; JANSEN, A.; KASER-HOTZ, B.; KLOPFLEISCH, R.; LOTZ, F.; LUGE, E.; NÖCKLER, K. Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1277–1282, nov. 2010.
- KORBA, A. A et al. *Leptospira ainlahdjerensis* sp. nov., *Leptospira ainazelensis* sp. nov., *Leptospira abararensis* sp. nov. and *Leptospira chreensis* sp. nov., four new species isolated from water sources in Algeria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 71, n. 12, p. 005148, 2021.
- KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481-489, 2017.
- KURILUNG, A et al. Chronology of emergence of the genus *Leptospira* and over-representation of gene families enriched by vitamin B2, B12 biosynthesis, cell adhesion and external encapsulating structure in *L. interrogans* isolates from asymptomatic dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 7-12, 2019.
- LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 791-807, 2003.
- LAU, C. L.; SMYTHE, L. D.; CRAIG, S. B.; WEINSTEIN, P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 10, p. 631-638, 2010.
- LAVINSKY, M. O.; SAID, R. A.; STRENZEL, G. M. R.; LANGONI, H. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 1, p. 79-84, 2012.

- LEE, S. H.; KIM, S.; PARK, S.C.; KIM, M.J. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 315-322, 2002.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 6, p. 435–448, 2004.
- LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: ADLER, B. (Ed **Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1 ed. Berlin: Heidelberg Springer editora, 2015, p. 11–20.
- LIEGEON, G.; DELORY, T.; PICARDEAU, M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of leptospira. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 5, p. 693-699, 2018.
- LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F. Z.; CORTEZ, A.; DE SOUZA, S. O.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 837-842, 2008.
- LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 1, p. 16-19, 2009.
- LIN, S.; YANG, L.; CHEN, G.; LI, B.; CHEN, D.; LI, L.; XU, Z. Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: biomass, viability and matrix. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 285-291, 2017.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 178, 2014.
- LIU, W.; RODER, H. L.; MADSEN, J. S.; BJARNSHOLT, T.; SORENSEN, S. J.; BURMOLLE, M. Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1366, 2016.
- LOURDAULT, K.; CERQUEIRA, G. M.; WUNDER, E. A.; PICARDEAU, M. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3711-3717, 2011.
- LOUREIRO, A. P.; MARTINS, G.; THOMÉ, S.; LILENBAUM, W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 119–126, 2013.
- LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- LUX, R.; MOTER, A.; SHI, W. Chemotaxis in pathogenic spirochetes: directed movement toward targeting tissues?. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 355-364, 2000.

- MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: **Goodman & Gilman. Pharmacological basis of Therapeutics**. 12. ed. New York (New York): AMGH editora, 2012, p. 1521 – 1528. ISBN 0071624422.
- MAGALDI, A. J.; YASUDA, P. N.; KUDO, L. H.; SEGURO, A. C.; ROCHA, A. S. Renal involvement in leptospirosis: a pathophysiologic study. **Nephron**, v. 62, n. 3, p. 332-339, 1992.
- MARRIE, T. J.; NELLIGAN, J.; COSTERTON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. **Circulation**, v. 66, n. 6, p. 1339-1341, 1982.
- MAJOR, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 7, p. 7242-7260, 2014.
- MAROTTO, P. C. F.; KO, A. I.; MURTA-NASCIMENTO, C.; SEGURO, A. C.; PRADO, R. R.; BARBOSA, M. C.; CLETO, S. A.; ELUF-NETO, J. Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. **Journal of Infection**, v. 60, p. 218–223, 2010.
- MARTIN, L. E. R. et al. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 3, p. 789-792, 2014.
- MARTINS, M. G.; MATOS, K. T. F.; SILVA, M. V.; ABREU, M. T. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. **Ocular immunology and inflammation**, v. 6, n. 2, p. 75-79, 1998.
- MASTRORILLI, C.; DONDI, F.; AGNOLI, C.; TURBA, M. E.; VEZZALI, E.; GENTILINI, F. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 3–10, 2007.
- MATSUMI, Y.; FUJITA, K.; TAKASHIMA, Y.; YANAGIDA, K.; MORIKAWA, Y.; MATSUMOTO-NAKANO, M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *S. treptococcus mutans*. **Molecular oral microbiology**, v. 30, n. 3, p. 217-226, 2015.
- MAURO, T.; HARKIN, K. Persistent leptospirosis in five dogs despite antimicrobial treatment (2000–2017). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 1, p. 42-47, 2019.
- MERRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRONS, I. S. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.
- MIOTTO, B. A.; GUILLOUX, A. G. A.; TOZZI, B. F.; MORENO, L. Z.; HORA, A. C.; DIAS, R. A.; HEINEMANN, M. B.; MORENO, A. M.; FILHO A. S. F.; LILENBAUM, W.; HAGIWARA, M. K. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 2018.
- MIOTTO, B. A.; MORENO, L. Z.; GUILLOUX, A. G. A.; SOUSA, G. O.; LOUREIRO, A. P.; MORENO, A. M.; LILENAUM, W.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; HAGIWARA, M. K. Molecular and serological characterization of the first *Leptospira*

santarosai strain isolated from a dog. **Acta Tropica**, v. 162, p. 1–4, out. 2016.

MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, F. K.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, R.; MORENO, L. Z.; COSTA, B. L.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 195–199, nov. 2013.

MIRAGLIA, F.; MORENO, L. Z.; MORAIS, Z. M.; LANGONI, H.; SHIMABUKURO, F. H.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTSKEERL, R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Characterization of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolated from swine in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 10, p. 1054-1061, 2015.

MIYAHARA, S.; SAITO, M.; KANEMARU, T.; VILLANUEVA, S. Y. a. M.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 4, p. 271–281, 2014

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 792–799, 2009.

MORENO, L. Z.; MIRAGLIA, F.; LILENBAUM, W.; NETO, J. S. F.; FREITAS, J. C.; MORAIS, Z. M.; COSTA, L. P.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A.. Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing—a continuous attempt at species and serovar differentiation. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2016.

MOUVILLE, C.; BENAROUDJ, N. Survival Tests for *Leptospira* spp. In: **Leptospira spp.** Humana, New York, NY, 2020. p. 215-228.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 37, 2016.

MURRAY, C. K.; HOSPENTHAL, D. R. Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1548-1552, 2004.

MURRAY, L. G. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Heidelberg, 2015, p. 139–185.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 46, n. 4, p. 245–52, 2013.

MWACHUI, M. A.; CRUMP, L.; HARTSKEERL, R.; ZINSSTAG, J.; HATTENDORF, J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–15, 17 set. 2015.

NALLY, J. E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X. Y.; FISHBEIN, M. C.; PEREIRA, M. M.; SILVA, J. J. P.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

NALLY, J. E.; HORNSBY, R. L.; ALT, D. P.; BAYLES, D.; WILSON- WELDER, J. H.;

- PALMQUIST, D. E.; BAUER, N. E. Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. **Veterinary microbiology**, v. 218, p. 25-30, 2018.
- NARDUCHE, L.; HAMOND, C.; MARTINS, G. M. S.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Recovery of leptospires in short-and medium-term cryopreservation using different glycerol and dimethyl sulfoxide concentrations. **Biopreservation and biobanking**, v. 14, n. 1, p. 81-83, 2016.
- NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPJETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 459–477, abr. 2004.
- NATIONAL INSTITUTES OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASE. **LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury, Tetracyclines.** Maryland (Bethesda), 2012– 2019. Nih. gov <https://livertox.nih.gov>, 2019.
- OIE. (2018). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** In OIE (Ed.), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal* (8th ed., Vol. 1–3, pp. 1–25). Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf
- OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian journal of veterinary research**, v. 66, n. 2, p. 86, 2002.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 47, p. e2437, 2011.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- PALANIAPPAN, R. U. M.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y.-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 20, p. 284–92, jun. 2007.
- PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.
- PAZ, L. N et al. Multidisciplinary approach in the diagnosis of acute leptospirosis in dogs naturally infected by *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae: A prospective study. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, xx,xx (xx) 101664.
- PAZ, L. N et al. Unusual case of polyarthritis and hepatorenal syndrome associated with *Leptospira interrogans* infection in a dog: A case report. **Research in Veterinary Science**, v. 134, p. 186-190, 2021.
- PETRAKOVSKY, J.; BIANCHI, A.; FISUN, H.; NÁJERA-AGUILAR, P.; PEREIRA, M. M. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002–2014). **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 10, p. 10770-10789, 2014.

- PETRI JR, W. A. Antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos beta-lactâmicos. In: **Goodman & Gilman. Pharmacological basis of Therapeutics**. 12. ed. New York (New York): AMGH editora, 2012a, p. 1477-1490. ISBN 0071624422.
- PETRI JR, W. A. Sulfonamidas, trimetoprima-sulfametoxazol, quinolonas e agentes para infecções do trato urinário. In: **Goodman & Gilman. Pharmacological basis of Therapeutics**. 12. ed. New York (New York): AMGH editora, 2012b, p. 1463-1476. ISBN 0071624422.
- PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; KEAN, M. J.; HOFFMANN, H.; PETIT, G. R.; TAN, R.; FRANKS, K. S.; HORTON, M. L. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.
- PICARDEAU, M. Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004039, 24 set. 2015.
- 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.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.
- PICARDEAU, Mathieu. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297-307, 2017.
- PINNA, M. H.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. **Tropical animal health and production**, v. 50, n. 4, p. 883-888, 2018.
- PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- POGGI, D.; GIUSEPPE, P. O.; PICARDEAU, M. Antibiotic resistance markers for genetic manipulations of *Leptospira* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4882-4885, 2010.
- PUCHE, R.; FERRÉS, I.; CARABALLO, L.; RANGEL, Y.; PICARDEAU, M.; TAKIFF, H.; IRAOLA, G. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 513–517, 2018.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006, p. 1094-1110.
- RATET, G.; VEYRIER, F. J.; d'ANDON, M. F.; KAMMERSCHIEIT, X.; NICOLA, M.; PICARDEAU, M.; BONECE, I. G.; WERTS, C. Live imaging of bioluminescent *Leptospira interrogans* in mice reveals renal colonization as a stealth escape from the blood defenses and antibiotics. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 12, p. e3359, 2014.
- REN, D.; MADSEN, J. S.; SORENSEN, S. J.; BURMOLLE, M. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific

cooperation. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 81-89, 2014.

REN, S-Xi et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

REPP, K. K.; MENOR, S. A.; PETTIT, R. K. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Medical mycology**, v. 45, n. 7, p. 603-607, 2007.

RESSNER, R. A.; GRIFFITH, M. E.; BECKIUS, M. L.; PIMENTEL, G.; MILLER, R. S.; MENDE, K.; FRASER, S. L.; GALLOWAY, R. L.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2750-2754, 2008.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHIMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309-1317, 2008.

RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Leptospirose : Atualização e perspectivas. **Microbiologia in foco**, v. 11, n. 3, p. 17–27, 2010.

SANTOS, A. A. N.; FIGUEIRA, C. P.; REIS, M. G.; COSTA, F.; RISTOW, P. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–4, 2015.

SANTOS, A. A. N., RIBEIRO, P. D. S., DA FRANÇA, G. V., SOUZA, F. N., RAMOS, E. A. G., FIGUEIRA, C. P.; REIS, M. G.; COSTA, F.; RISTOW, P. *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 2021.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, mar. 2015.

SCHULZ, B. S.; SEYBOLD, N.; ADAMIK, K. N.; LUDWIG, E.; HARTMANN, K. Ileocolic intestinal intussusception in a dog with leptospirosis. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere**, v. 38, n. 06, p. 403-405, 2010.

SESSIONS, J. K.; GREENE, C. E. Canine leptospirosis: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. **Compendium on continuing education for the practising Veterinarian-North American Edition**, v. 26, n. 8, p. 606-624, 2004.

SINGH, R.; STINE, O. C.; SMITH, D. L.; SPITZNAGEL JR, J. K.; LABIB, M. E.; WILLIAMS, H. N. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3412-3420, 2003.

SLACK, A. T.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; SMYTHE, L. D. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 95, 2006.

SONET, J.; BARTHELEMY, A.; THOLLOT, I. G.; NEVORET, C. P. Prospective evaluation of abdominal ultrasonographic findings in 35 dogs with leptospirosis. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 59, n. 1, p. 98-106, 2018.

- SOUPÉ-GILBERT, M. BIERQUE, E.; GEROULT, S.; TEURLAJ, M.; GOARANT, C. Continuous excretion of *Leptospira borgpetersenji* ballum in mice assessed by viability quantitative polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 4, p. 1088-1093, 2017.
- STODDARD, R.A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; McCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.
- STRAUB, M. H. et al. Raccoons (*Procyon lotor*) and Striped Skunks (*Mephitis mephitis*) as Potential Reservoirs of *Leptospira* spp. in California. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 6, p. 418-426, 2020.
- STRUTZBERG-MINDER, K. S.; KREIENBROCK, L. Leptospireninfektionen beim schwein: epidemiologie, diagnostik und weltweites vorkommen. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, Berlin**, v. 124, n. 9-10, p. 345-359, 2011.
- SUEPAUL, S. M.; CARRINGTON, C.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A. A. Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* isolates from dogs and rats to 12 antimicrobial agents. **Tropical biomedicine**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2015.
- SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1–13, jan. 2011.
- TANGEMAN, L. E.; LITTMAN, M. P. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 9, p. 1316–1322, 1 nov. 2013.
- THIBEAUX, R.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2018.
- THIBEAUX, R.; KAINIU, M.; GOARANT, C. Biofilm Formation and Quantification Using the 96-Microtiter Plate. In: **Leptospira spp.** Humana, New York, NY, 2020. p. 207-214.
- THIBEAUX, R.; SOUPÉ-GILBERT, M.; KAINIU, M.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; FERNANDES, J.; BAHRE, H.; DOUYERE, A.; ESKENAZI, N.; VINH, J.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2020.
- THIBEAUX, Roman et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005414, 2017.
- TOCHETTO, C.; FLORES, M. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; FIGHERA, R, A. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 430-443, 2012.
- TOWNSEND, W. M.; STILES, J.; KROHNE, S. G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. **Veterinary ophthalmology**, v. 9, n. 3, p. 169-173, 2006.

- TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 848-853, 2002.
- TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.
- UZUNOGLU, S.; KARACA, B.; ATMACA, H.; KISIM, A.; SEZGIN, C.; KARABULUT, B.; USLU, R. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (–/– gossypol). **Toxicology mechanisms and methods**, v. 20, n. 8, p. 482-486, 2010.
- VAN DE MAELE, I.; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F.; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: A review with emphasis on clinical aspects. **Veterinary Record**, v. 163, n. 14, p. 409–413, 2008.
- VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, K.; NEELA, V. K.; BERNET, E.; THIBEAUX, R.; ISMAIL, N.; KHALID, M. N. M.; AMRAN, F.; MASUZAWA, T.; NAKAO, R.; KORBA, A. M.; BOURHY, P.; VEYRIER, F. J.; PICARDEAU, M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.
- VINOD KUMAR, K.; LALL, C.; RAJ, R. V.; VEDHAGIRI, K.; SUNISH, I. P.; VIJAYACHARI, P. In vitro antimicrobial susceptibility of pathogenic *Leptospira* biofilm. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 7, p. 511-514, 2016a.
- VINOD KUMAR, K.; LALL, C.; RAJ, R. V.; VEDHAGIRI, K.; VIJAYACHARI, P. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. **Letters in applied microbiology**, v. 62, n. 4, p. 311-315, 2016b.
- VINOD KUMAR, K.; LALL, C.; RAJ, R. V.; VEDHAGIRI, K.; SUNISH, I. P.; VIJAYACHARI, P. Can subminimal inhibitory concentrations of antibiotics induce the formation of biofilm in *Leptospira*?. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 1040-1042, 2018.
- VINOD KUMAR, K.; LALL, C.; RAJ, R. V.; VEDHAGIRI, K.; VIJAYACHARI, P. et al. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 6, p. fiv051, 2015.
- VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.
- WANG, Y et al. Distribution of plasmids in distinct *Leptospira* pathogenic species. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 11, p. e0004220, 2015.
- WEBB, J. S. et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4585-4592, 2003.
- WOLBACH, S. B.; BINGER, C. A. L. Notes on a filterable spirochete from fresh water. *Spirocheta biflexa* (new species). **The Journal of medical research**, v. 30, n. 1, p. 23, 1914.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Medicines Situation 2011: Rational use of antibiotics. **Geneva, Switzerland: WHO**, 2011.

YANG, C. W.; WU, M. S.; PAN, M. J. Leptospirosis renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. suppl 5, p. 73–77, 2001.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 407–415, 1987.

YIN, W. et al. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

ZHU, W et al. Isolation and characterization of two novel plasmids from pathogenic *Leptospira interrogans* serogroup Canicola serovar Canicola strain Gui44. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3103, 2014.