

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

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS DE *LEPTOSPIRA*
INTERROGANS ISOLADAS DE CÃES, HUMANO E ROEDOR EM UM
MESMO CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

LUCAS NOGUEIRA PAZ

Salvador - BA

2022



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

ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS DE *LEPTOSPIRA*
***INTERROGANS* ISOLADAS DE CÃES, HUMANO E ROEDOR EM UM**
MESMO CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

LUCAS NOGUEIRA PAZ

Mestre em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador - BA

2022

LUCAS NOGUEIRA PAZ

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS DE *LEPTOSPIRA*
INTERROGANS ISOLADAS DE CÃES, HUMANO E ROEDOR EM UM
MESMO CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim

Coorientadora: Dra. Camila Hamond Regua Motta Reis

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima

SALVADOR - BA

AGOSTO DE 2022

Ficha catalográfica

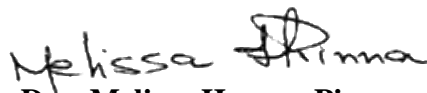
Análise comparativa de genomas de *Leptospira interrogans* isoladas de cães, humano e roedor no mesmo cenário epidemiológico

LUCAS NOGUEIRA PAZ

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 22 de agosto de 2022

Comissão examinadora:



**Dra. Melissa Hanzen Pinna
Valentim
Orientadora
(EMEVZ / UFBA)**

**Dra. Flávia Figueira Aburjaile
(UFMG)**

**Dr. Odir Antônio Dellagostin
(UFPEL)**

**Dr. Felipe Fornazarie
(UNESP)**

**Ricardo Wagner Dias Portela
(UFBA)**



**Luis Fernando Pita Gondim
Coordenador PPGCAT
EMEVZ / UFBA**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS NOGUEIRA PAZ – Nascido em 28 de fevereiro de 1990, na cidade de Riacho de Santana. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (2016). Durante o período de 2012 a 2016 foi bolsista de Iniciação científica (CNPq/FAPESB) no Laboratório de Bacterioses do Hospital de Medicina Veterinária Renato de Medeiros Neto - HOSPMEV/UFBA onde participou de atividades de pesquisa e rotina relacionadas ao diagnóstico de doenças infecciosas, com ênfase ao estudo da leptospirose animal. Exerceu atividade de monitoria junto à disciplina Inspeção e Tecnologia de Carne e Derivados. É mestre em Ciência Animal nos Trópicos, com ênfase em saúde animal e epidemiologia da Leptospirose. Durante o período do mestrado, foi bolsista (Capes) no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ-UFBA) no período de 2016-2018. No o período do doutoramento foi, inicialmente, bolsista Fapesb e posteriormente capes onde desenvolveu estudos relacionados a epidemiologia molecular da leptospirose.

À minha família de sangue e às famílias que me escolheram e acolheram dedico este trabalho. Na minha caminhada não faltou amor, carinho e compreensão e a vocês, sou grato.

AGRADECIMENTOS

À Professora Melissa Hanzen Pinna, orientadora e amiga, por todas os ensinamentos, pela confiança depositada e, sobretudo, pelo incentivo em melhorar sempre. Agradeço imensamente por me acolher todos esses anos e ressalto o meu mais profundo respeito e meu sincero obrigado.

À Dra. Camila Hamond, coorientadora querida, pelo auxílio com o sequenciamento das cepas, por sempre compartilhar ideias incríveis e pela contribuição em minha formação intelectual. Muito obrigado por todos esses anos de colaboração.

À professora Alessandra Estrela da Silva Lima, por me coorientar e tornar possível a realização de parte desse trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Bacterioses (LABAC), Marta, Maria e Mari, pela amizade e tempo de convívio. Aos amigos de pós, Carla Dias e Rodrigo de Carvalho, pelo auxílio nos mais diversos experimentos e nas várias semanas de análise de amostras e aos meus “ICs”, queridos estagiários que tanto me ensinaram nesses anos de tutoria.

À Dra. Luciane Amorim Santos e a doutoranda Laíse de Moraes pelo auxílio nas análises dos genomas.

Aos queridos amigos que se mantiveram comigo durante esses tempos pandêmicos e que me permitiram passar por tudo de uma forma menos trágica.

À Universidade Federal da Bahia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, pela oportunidade concedida.

Às fontes de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão do auxílio financeiro durante o doutorado.

Aos membros da banca de qualificação e/ou defesa que gentilmente aceitaram participar dessa avaliação e pelas válidas críticas e sugestões.

Não se trata de um percurso que leva a um destino, mas sim de um destino que se esgota num percurso cujo total valor está no passo-a-passo da transitoriedade do trânsito.

Clóvis de Barros Filho.

RESUMO

PAZ, L. N. **Análise comparativa de genomas de *Leptospira interrogans* isoladas de cães, humano e roedor em um mesmo cenário epidemiológico**, Salvador, 2022. 97p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia.

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de caráter zoonótico com importante impacto na saúde pública. O conhecimento sobre a circulação e diversidade de cepas patogênicas de *Leptospira* e sua interação com os hospedeiros, em diferentes cenários epidemiológicos, é fundamental para o controle e profilaxia da leptospirose. A genômica comparativa auxilia na compreensão de mecanismos de infecção, bem como resistência ou susceptibilidade à antimicrobianos, sendo tais aspectos da patogênese da leptospirose muito pouco compreendidos. O presente estudo objetivou comparar o genoma de cepas de *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isoladas a partir de amostras de cães, roedor e humanos, em um mesmo cenário epidemiológico. Foi realizado o sequenciamento de quatro isolados (C20, C29, C51, C82) de *L. interrogans* obtidos de amostras de sangue e urina de cães naturalmente infectados e com sintomatologia clínica. Adicionalmente, foram recuperados do GenBank os dados brutos de sequenciamento de uma cepa isolada a partir de amostra de roedor e o arquivo FASTA contendo a sequência da cepa de referência L1-130, isolada de amostra de humanos, ambas provenientes do mesmo cenário epidemiológico que as amostras de cães. Após avaliação da qualidade das leituras, sequências (caninas e roedor) foram submetidas ao *pipeline* de montagem visando a obtenção de *contigs* e/ou *scaffolds* de alta qualidade. Posteriormente, realizou-se análise de filogenia utilizando o gene *ppk*, com auxílio do programa MEGA-X, e a identidade média de nucleotídeos foi calculada com auxílio do programa pyani. A anotação dos genomas foi realizada com os programas PGAP e RAST. Por fim, a sintenia e a comparação entre o conteúdo gênico foram realizadas com auxílio dos programas BRIG, Artemis e Mauve. O *pipeline* utilizado permitiu a obtenção de dois *scaffolds* correspondentes aos cromossomos 1 e 2, em cada uma das amostras. A profundidade mínima observada foi de 81,9 para a amostra C20; e todas as sequências apresentaram cobertura maior que 99%. As análises filogenética e de similaridade genômica permitiram a confirmação dos isolados como *L. interrogans*. Quando comparados com a cepa de referência, os genomas dos isolados de caninos e de roedor apresentaram alta identidade e sintenia. Entretanto, também se pode observar pequenas regiões de diferença, sobretudo

quanto ao genoma obtido em amostra de roedor. Foi observada a presença de 23 genes potencialmente associados à formação de biofilme, com identificação de mutações *missense* em sete genes. A obtenção de genomas com alta qualidade ainda permanece como uma tarefa desafiadora e é indispensável na genômica comparativa, funcional e estrutural. Frente a necessidade do entendimento sobre as bases moleculares envolvidas na formação de biofilme, é de fundamental importância compreender qual efeito das mutações na expressão do fenótipo (biofilme) entre diferentes sorovares. Os dados obtidos nos permitem inferir que cães, roedores e humanos são infectados com cepas altamente relacionadas ressaltando que esses animais desempenham importante papel na saúde pública.

Palavras chave: Saúde pública, Genômica comparativa, Identidade média de nucleotídeos, *Leptospira* spp., Sequenciamento de nova geração

ABSTRACT

PAZ, LN **Comparative genomic analysis of *Leptospira interrogans* isolated from dogs, human and rodent in the same epidemiological setting**, Salvador, 2021. 97p. Thesis (PhD degree in Animal Science in the Tropics) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia.

Leptospirosis is a zoonotic infectious disease associated with a relevant impact on public health. The knowledge on the circulation and diversity of pathogenic *Leptospira* and its interaction with hosts, in different epidemiological scenarios, is essential for leptospirosis control and prophylaxis. Comparative genomics assist in understanding of the mechanisms of infection, as well as the antimicrobial profile, and the several aspects of the pathogenesis of leptospirosis that are poorly understood. The present study aimed to compare the genome of *Leptospira interrogans*, serogroup Icterohaemorrhagiae, isolated from dogs, rodent, and human, in a same epidemiological scenario. A Whole genome sequencing was performed on four isolates (C20, C29, C51, C82) of *L. interrogans* obtained from blood and urine samples of naturally infected dogs with clinical symptoms. Additionally, raw sequencing data of a strain isolated from a rodent sample and the FASTA file containing the sequence of the reference strain L1-130 isolated from human sample were retrieved from GenBank, both strains recovered from the same epidemiological scenario as the dog samples. After evaluating the quality of the readings, the sequences (canine and rodent) were submitted to the assembly pipeline in order to obtain high-quality contigs and/or scaffolds. Subsequently, phylogenetic analysis were constructed with the *ppk* gene sequence, using the MEGA-X software, and the average nucleotide identity was calculated with the aid of the pyani software. Genome annotation was performed using the PGAP and RAST software. Finally, the synteny and comparison between the gene content was carried out with the aid of the BRIG, Artemis and Mauve software. The pipeline used herein allowed to obtain, in each sample, two scaffolds corresponding to chromosomes 1 and 2. The minimum depth observed was 81.9 for the C20 stain and all sequences showed coverage greater than 99%. Phylogenetic and genomic similarity analyses confirmed the isolates as *L. interrogans*. When compared to the reference strain, the genomes of canine and rodent isolates showed high identity and synteny. However, small different regions could also be observed, especially in the genome obtained from a rodent sample. The presence of 23 genes potentially associated with biofilm

formation was observed, with identification of missense mutations in seven genes. Obtaining high quality genomes still remains a challenging task and is indispensable in comparative, functional and structural genomics. In view of the need to understand the molecular bases involved in biofilm formation, it is of fundamental importance to understand the effect of mutations on the expression of the phenotype (biofilm) between different serovars. The data obtained herein allow to infer that the dogs, rodents and humans from this epidemiological scenario are infected with highly related strains, emphasizing the relevant role these animals play in public health.

Key words: Public health, Comparative genomics, Average nucleotide identity, *Leptospira* ssp., Next-generation sequencing

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Árvore filogenética construída com sequências do gene <i>ppk</i> para avaliar a relação entre as cepas do presente estudo e as 19 espécies de <i>Leptospira</i> que compõem o subclados P1 (antigo clado das espécies patogênicas). 45
Figura 2	Representação gráfica da matriz da identidade média de nucleotídeos (ANIb) entre os genomas das cepas do presente estudo e as sequências de 68 espécies do gênero <i>Leptospira</i> 46
Figura 3	Representação gráfica da matriz da identidade média de nucleotídeos (ANIb) entre os genomas das cepas do presente estudo e as sequências de espécies que compõem o subclado P1. 47
Figura 4	Relação filogenética entre cepas de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni. A árvore filogenética foi construída pelo método ML com 1.000 repetições <i>bootstrap</i> , e descreve a relação filogenética entre cepas pertencentes ao sorovares Copenhageni isolados em diferentes localidades geográficas..... 49
Figura 5	Mapa circular dos genomas do cromossomo 1 de cinco isolados clínicos de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae. obtidos em amostras de cães, roedor e humano. 51
Figura 6	Mapa circular dos genomas do cromossomo 2 de cinco isolados clínicos de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidos em amostras de cães, roedor e humano..... 52
Figura 7	Avaliação da sintenia entre as sequências do cromossomo 1 (a, b, c) e do cromossomo 2 (d, e, f) das cepas de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isoladas em amostras de cães, roedor e humano em um mesmo cenário epidemiológico..... 53
Figura 8	Análise comparativa entre genomas de isolados de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectado, humano e roedor usando a ferramenta Mauve, (a) cromossomo 1, (b) cromossomo 2. 54

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Resumo sobre a origem e caracterização prévia das cepas de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isolados na cidade de Salvador, Bahia – Brasil, e inclusas neste estudo	34
Tabela 2	Descrição da qualidade do sequenciamento de isolados de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectados	39
Tabela 3	Principais parâmetros referentes a qualidade da montagem de genoma de isolados de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectados	40
Tabela 4	Informações a respeito do processo de <i>scaffolding</i> e fechamento de <i>gaps</i> de genomas de isolados de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães e roedor naturalmente infectados	41
Tabela 5	Parâmetros referentes à anotação de genoma de isolados de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectado, humano e roedor	41
Tabela 6	Distribuição do número de funcionalidades em cada subsistemas em genomas de cepas de <i>L. interrogans</i> obtidas em a partir de amostras de cães, humano e roedores em um mesmo cenário epidemiológico	42
Tabela 7	Análise de variantes no genoma de leptospiras isoladas a partir de amostras de cães e roedores provenientes da cidade de Salvador – Bahia, Brasil	44
Tabela suplementar 1	Comparação da performance dos cinco programas destinados à montagem de genoma bacterianos sequenciados na plataforma MiSeq Illumina	76
Tabela suplementar 2	Informações gerais de todas as sequências de <i>Leptospira</i> spp. usadas neste estudo (incluindo números de acesso)	78
Tabela suplementar 3	Relação de profago incompleto preditos no genoma das cepas de	

	<i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães, humano e roedor	80
Tabela suplementar 4	Predição de sistemas CRISPR-cas em genomas de <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães, humano e roedor	81
Tabela suplementar 5	Comparação de polimorfismos encontrados em sequências de nucleotídeos/proteínas com domínios de c-di-GMP presentes em cepas <i>L. interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidos a partir de amostras de cães, roedor e humano com <i>L. interrogans</i> sorovar Lai	83
Tabela suplementar 6	Valores de ANI (%) para comparação entre as cepas isoladas a partir de amostras cães, roedor e humano, obtidas no mesmo cenário epidemiológico. As comparações foram realizadas usando BLASTn, (BLAST+), parâmetro ANIb	84
Tabela suplementar 7	Informações gerais de todas as sequências de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni utilizadas para a construção da árvore filogenética baseada em SNPs	85

LISTA DE SIGLAS

ACT	<i>Artemis Comparison Tool</i>
ANI	Análise da identidade média de nucleotídeos (<i>Average Nucleotide Identity</i>)
APHIS	<i>Animal and Plant Health Inspection Service</i>
BRIG	<i>BLAST Ring Image Generator</i>
CAAT	Teste de Aglutinação Microscópica com Absorção Cruzada (<i>cross-agglutinin absorption test</i>)
c-di-GMP	Guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica
CDSs	sequências codificadoras (<i>Coding Sequences</i>)
cgMLST	<i>Core-Genome MLST</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRNL	Centro de Referência Nacional para Leptospirose
dDDH	<i>Digital DNA-DNA hybridization</i>
DGC	<i>Diguanilato ciclase</i>
EMEVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
EPS	Substâncias exopoliméricas
Fapesb	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto
LABAC	Laboratório de Bacterioses
mAbs	Anticorpos monoclonais
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MLST	Tipagem de sequência multilocus (<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>)

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	RNA não codificante
ND	Não determinado
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next-generation sequencing</i>)
NVSL	<i>National Veterinary Services Laboratories</i>
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
PDE	Fosfodiesterases específicas
PGAP	<i>Prokaryotic Genome Annotation Pipeline</i>
<i>ppk</i>	Polifosfato quinase (<i>Polyphosphate kinase I</i>)
rRNA	RNA ribossômico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRA-NCBI	<i>Sequence Read Archive</i>
tRNA	RNA transportador
UFBA	Universidade Federal da Bahia
USA	<i>United States of America</i>
USDA	<i>U.S. Department of Agriculture</i>
VNTR	Análise do número variável de sequências repetitivas em tandem

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 HISTÓRICO	22
2.2 ETIOLOGIA	23
2.3 CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>LEPTOSPIRA</i>	24
2.3.1 Classificação sorológica	24
2.3.2 Classificação genotípica	25
2.4 EPIDEMIOLOGIA	26
2.5 ANÁLISE GENÔMICA DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP.	28
2.5.1 Montagem de genoma	30
2.5.2 Caracterização de genes de virulência	31
3 HIPOTESE	33
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 SELEÇÃO DAS CEPAS DE LEPTOSPIRAS E EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	34
5.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS DADOS BRUTOS	35
5.3 MONTAGENS, ANOTAÇÃO E ANÁLISE DOS GENOMAS	36
5.4 CHAMADA DE VARIANTES	37
5.5 IDENTIDADE MÉDIA DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE DE FILOGENIA	37
5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS	38
6 RESULTADOS	39
6.1 ANÁLISE INICIAL DOS GENOMAS	39
6.2 MONTAGENS E ANOTAÇÃO	39
6.2.1 Análise dos genes de virulência	43
6.3 CHAMADA DE VARIANTE	44
6.4 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	44

6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS	50
7 DISCUSSÃO	55
7.1 MELHORIA DA MONTAGEM DO GENOMA	55
7.2 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA .	55
7.3 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS	57
7.4 ANOTAÇÃO GENÔMICA	58
7.4.1 Fago, sistema CRISPR-Cas e fator de virulência	59
7.4.2 Genes relacionados a formação de biofilme	60
8 CONCLUSÕES	61
9 REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de caráter zoonótico, causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira* (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010), que acometem diversas espécies de mamíferos e os tornam, potencialmente, importantes fontes de infecção (ELLIS, 2015). Mundialmente, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública. Estima-se que anualmente há cerca de 1,03 milhão de novos casos humanos em todo mundo (COSTA et al., 2015). Em Salvador, esta zoonose é responsável por epidemias anuais que acometem principalmente indivíduos residentes em locais sem infraestrutura adequada. A incidência média anual de internações por leptospirose no local foi de 57,8 casos por 100.000 habitantes (entre 1996 e 2002), com taxa de infecção por *Leptospira* de 37,8 por 1.000 pessoas-ano (FELZEMBURGH et al., 2014).

Em ambientes urbanos, os roedores sinantrópicos são os principais hospedeiros crônicos e transmissores da leptospirose (FARIA et al., 2008). Por outro lado, cães podem ser possíveis fontes de infecção, uma vez que estes animais vivem em contato direto com os seres humanos e, em alguns casos, eliminam leptospiras viáveis na urina durante longos períodos sem mesmo apresentar sinais clínicos compatíveis com a doença (MIOTTO et al., 2018a; ROSSETTI et al., 2005). No entanto, é mais comumente observado o curso agudo, desencadeado por sorovares incidentais (BALBONI et al., 2020; MIOTTO et al., 2018b; PAZ et al., 2021a, 2021b; SANTOS et al., 2021b). Paz e colaboradores (2021a) isolaram leptospiras de urina de cães com leptospirose aguda e destacaram uma possível participação desses animais no ciclo da enfermidade. Em adição, por manter maior contato com as principais fontes de infecção, é sugerido que os cães possam ser utilizados como animais sentinelas para a leptospirose em humanos (SANTOS et al., 2021b; SPANGLER et al., 2020).

O isolamento de *Leptospira* spp. é considerado como método definitivo para o diagnóstico da enfermidade (SYKES et al., 2011), sendo indispensável para compreensão da epidemiologia e formulações de métodos de profilaxia, controle e diagnóstico da enfermidade (LOFFLER et al., 2014; MIRAGLIA et al., 2012; LARSON et al., 2017; PAZ et al., 2021b; SANTOS et al., 2021b).

O gênero *Leptospira* é composto por 68 espécies e demonstra a maior variação genômica observada entre espiroquetas. Apresenta em seu genoma dois cromossomos celulares com comprimento que varia de 3,4 a 5,2 Mb (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019; KORBA et al., 2021; VINCENT et al., 2019). Tal variabilidade no comprimento do

genoma proporciona à bactéria a capacidade de viver em diferentes ambientes e de se adaptar a um número elevado de hospedeiros (PICARDEAU et al., 2008).

Estudos voltados ao sequenciamento e comparação de dados genômicos são pouco frequentes na literatura (AGAMPODI; VINETZ, 2021). O sequenciamento de cepas nativas favorece a identificação precisa, fornece informações a respeito da evolução do agente, além de conhecimento acerca de genes relacionados à virulência, resistência antimicrobianas e adaptabilidade (FOUTS et al., 2016). O uso de sequenciamento de nova geração tem sido empregado em análises comparativas da diversidade genética entre leptospiros saprofíticas e patogênicas (LATA et al., 2020; PICARDEAU et al., 2008), e entre as diferentes espécies de leptospiros patogênicos isoladas em humanos e outros animais (XU et al., 2016). A comparação do genoma de leptospiros obtidas em animais e humanos pode auxiliar na caracterização epidemiológica da enfermidade, destacando sua importância para a saúde pública. Moreno e colaboradores (2018) realizaram a comparação de isolados do sorovar Canicola obtidos de suínos e humanos e observaram alta similaridade, indicando que as cepas suínas também podem representar um risco maior para a saúde pública do que o esperado, uma vez que esses animais podem ser a fonte de infecção para humanos.

Doenças zoonóticas bacterianas, como a leptospirose, causam elevada mortalidade e morbidade em humanos. No entanto, essas enfermidades são tratáveis com antibióticos e muitas delas podem ser evitadas, por meio de estratégias de saúde única (GOARANT; DELLAGI; PICARDEAU, 2021). Portanto, é necessária uma compreensão mais aprofundada da circulação e diversidade das espécies de patógenos e sua interação com os potenciais hospedeiros em diferentes cenários epidemiológicos. Desta forma, o sequenciamento, montagem e anotação do genoma de cepas de *Leptospira* isoladas a partir de amostras clínicas provenientes de diferentes animais tornam-se essenciais para melhor compreensão da enfermidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa com expressiva importância na saúde pública (COSTA et al., 2015) e animal (CILIA et al., 2021; ELLIS, 2015). O primeiro relato da enfermidade ocorreu em 1886 e é atribuído ao médico alemão Adolph Weil, que descreveu um tipo particular de icterícia associada a esplenomegalia, disfunção renal, conjuntivite e erupções cutâneas - Doença de Weil (ADLER, 2015). Apesar do acima exposto, textos sugerem a ocorrência de alguns surtos de leptospirose na antiguidade, quase sempre associados a atividades laborais (FAINE, 1999).

A primeira evidência de espiroquetas relacionadas à enfermidade foi descrita em 1907, por Stimson, que, com a ajuda da técnica de impregnação pela prata, observou a presença de organismos espiralados em forma de interrogação (à época, chamados de *Spirocheta interrogans*) em secções de parênquima renal de um paciente suspeito de ter morrido em decorrência de febre amarela (STIMSON, 1907).

O primeiro isolamento de leptospiras patogênicas foi realizado por Inada e colaboradores, em 1914, no Japão (INADA et al., 1916). Primariamente, a infecção foi reproduzida em cobaios (porquinho da índia - *Cavia porcellus*) inoculados com sangue de mineradores diagnosticados com Doença de Weil. Em seguida, os autores conseguiram propagar leptospiras viáveis *in vitro* e nomearam-nas *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Ainda, esse trabalho foi responsável por uma série de contribuições relacionadas à transmissão, rotas de infecção, sinais e sintomas, bem como morfologia e motilidade de *Leptospira* spp. Estudos realizados por dois grupos alemães em 1916 também descreveram, quase que simultaneamente, a observação e reprodução da enfermidade em porquinhos-da-índia, reforçando assim bactérias do gênero *Leptospira* como agente etiológico para leptospirose (ADLER, 2015).

Isolamento de leptospiras em animais datam de 1916 e foram obtidos a partir de roedores silvestres, tanto no continente Europeu quanto nos Estados Unidos da América. No ano seguinte, Ido e colaboradores propuseram o estabelecimento da leptospirose como enfermidade zoonótica ao comprovar o papel dos roedores na transmissão para humanos (IDO et al., 1917). Um ano depois, foi proposto o agrupamento dos microrganismos recém isolados em um novo gênero, diferenciando-os assim dos demais gêneros de espiroquetas até então descritos (NOGUCHI, 1918). Entretanto, o reconhecimento da *Leptospira* como agente

etiológico causador da leptospirose só ocorreu em humanos e animais em 1948 e 1958, respectivamente (ALSTON; BROOM, 1958; VAN THIEL, 1948)

No Brasil, o primeiro relato da Doença de Weil foi realizado por McDowell, no estado do Pará em 1911 (ALEXANDER, 1960). Segundo relatos históricos, os primeiros isolados foram obtidos em roedores naturalmente infectados nas cidades do Rio de Janeiro (1917) e São Paulo (1918) e são atribuídos a Beaurepaire de Aragão e Carini, respectivamente (ENRIETTI, 2001). Apesar de diferentes espécies já terem sido descritas em todo território nacional, há uma carência na literatura de estudos que voltados ao isolamento e caracterização de espécies de leptospiros, sobretudo recuperados de infecções naturais.

2.2 ETIOLOGIA

Etimologicamente, a palavra leptospira deriva do grego e significa espira fina, (*leptos*: fino, pequeno, delicado; *speira*: espira) (TRABULSI, 2015). *Leptospira* são bactérias helicoidais que medem entre 6 e 20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). O gênero *Leptospira* pertencente ao filo Spirochaetes, ordem Spirochaetales, família *Leptospiraceae*, e é composto por bactérias aeróbicas estritas, com movimentação ativa (WHO, 2003). A família *Leptospiraceae*, é composta por três gêneros e, dentre esses, *Leptospira* mantém o grupo mais profundamente ramificado. Tais microrganismos mantém morfologia e fisiologia uniforme e apresentam constituição fenotípica e genômica divergentes (LEVETT, 2015).

A combinação de fatores ligados à estrutura do endoflagelo, tais como ligação subterminal, cobertura celular incompleta e rotação direcional proporcionam que as espécies desse gênero apresentem tipicamente extremidades curvas similares a ganchos, conferindo-as formato de “S” ou de “C” (TRABULSI, 2015). Leptospiros são espiroquetas que possuem parede celular semelhantes às bactérias Gram negativas. Descritas como fastidiosas e de crescimento lento, requerem meios especiais e condições ótimas de temperatura de 28 a 30°C e pH 7,2 a 7,6 (CAMERON, 2015). Recentemente, foi proposta a utilização do meio Hornsby-Alt-Nally (HAN), que permite o crescimento e recuperação, à temperatura de 37°C, de leptospiros provenientes de amostras de rins de animais experimentalmente infectados (HORNSBY; ALT; NALLY, 2020).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *LEPTOSPIRA*

A classificação de leptospiros teve como marco inicial a proposta formal para a criação da família *Leptospiraceae*, em 1979 (HOVIND-HOUGEN, 1979). Posteriormente, foi então aceita pelo Subcomitê da Taxonomia de *Leptospira* a divisão do gênero em duas espécies, com *L. interrogans* contendo os sorovares patogênicos e *L. biflexa* contendo os sorovares saprofíticos (FAINE; STALLMAN, 1982). Com o advento das técnicas moleculares, a classificação taxonômica oficial deixou de ser fenotípica, embora ainda permaneça amplamente utilizada na clínica médica e para vacinação, e passou a ser baseada na avaliação da molécula de DNA (AHMED et al., 2006; MERIEN et al., 1992; VINCENT et al., 2019; YASUDA et al., 1987).

2.3.1 Classificação sorológica

A classificação sorológica (fenotípica) baseia-se na utilização do teste de soroprecipitação microscópica (MAT) para identificação do sorogrupo. Recentemente, foi proposto, que quando possível, os sorovares poderão ser determinados com um painel de anticorpos monoclonais (mAbs) adequados (LEVETT; PICARDEAU, 2021). Quando resultado for inconclusivo no teste com mAbs, a determinação do sorovar deve ser realizada através do teste de aglutinação microscópica com absorção cruzada (*Cross-Aglutinin Absorption Test* - CAAT) para identificação dos sorovares (BHARTI et al., 2003; OIE, 2021). As cepas são subdivididas em sorovares (táxon primário) de acordo com o polimorfismo dos carboidratos que compõem os lipopolissacarídeos presentes na parede celular externa. Ainda, os sorovares antigenicamente relacionados são distribuídos em 30 sorogrupos (PICARDEAU, 2017a). A separação de *Leptospira* em sorovares e sorogrupos permite a formação de dois grandes grupos: *Leptospira biflexa* sensu lato, composto por mais de 60 sorovares de leptospiros saprofíticos (não patogênicos); e *Leptospira interrogans* sensu lato, com mais de 250 sorovares patogênicos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Historicamente, a separação de leptospiros em sorovares e sorogrupos é essencial para a compreensão da interação agente-hospedeiro. A literatura reporta que hospedeiros de manutenção tendem a manter relação estável com determinados sorovares, desencadeando a enfermidade de curso crônico. Entretanto, infecções com sorovares incidentais normalmente desencadeiam infecção aguda (FAINE, 1999). A partir do final dos anos 80, com a inserção de técnicas moleculares para a especiação das leptospiros, observou-se que vários sorovares

poderiam ser representados por cepas pertencentes a diferentes espécies de *Leptospira* (LEVETT, 2001). Atualmente, divisão em sorogrupos não têm valor taxonômico. Todavia, a classificação sorológica ainda é amplamente utilizada na epidemiologia e na clínica médica, uma vez que permanecem úteis para o diagnóstico sorológico e para a compreensão epidemiológica em níveis regionais e/ou populacionais, bem como para a formulações de vacina (LEVETT, 2001; PAILHORIÈS et al., 2015; SUEPAUL et al., 2010).

2.3.2 Classificação genotípica

O desenvolvimento e difusão das técnicas moleculares incentivou, a partir de 1987, a substituição da classificação sorológica pela classificação genotípica. Primariamente, a distinção das espécies se baseava na hibridização DNA-DNA, separando-as em diversas espécies genômicas, correspondendo a grupos com DNA relacionado (YASUDA et al., 1987). Posteriormente, a classificação começou a ser realizada com base no sequenciamento parcial de diferentes genes, sejam esses de forma isolada, *rrs* (16S) (MERIEN et al., 1992), ou associados em painéis de tipagem de sequência multilocus (*Multi-Locus Sequence Typing* – MLST) (AHMED et al., 2006; BOONSILP et al., 2013; VARNI et al., 2014). Tal metodologia permitiu que as espécies de *Leptospira* passassem a ser classificadas em patogênicas, intermediárias e saprófitas.

As melhorias na técnica de isolamento de leptospira, sobretudo proveniente do solo, associada ao aumento da disponibilidade e qualidade dos métodos de sequenciamento de última geração (NGS, *Next-generation sequencing*), oferecem maior oportunidade para identificar novas espécies de *Leptospira* (VINCENT et al., 2019). Recentemente, diversos estudos propuseram um novo esquema de classificação sistemática de espécies de *Leptospira* baseadas na genômica comparativa (CASANOVAS-MASSANA et al., 2021a; GRILLOVÁ; PICARDEAU, 2020; LEVETT; PICARDEAU, 2021; MASUZAWA et al., 2019; PUCHE et al., 2018; VINCENT et al., 2019). Hoje, a classificação aceita é fundamentada na utilização da Hibridização DNA-DNA ou de similaridade genômica *in silico* através da Análise da Identidade média de nucleotídeos (ANI, *Average Nucleotide Identity*) e/ou Hibridização DNA-DNA *in silico* (*Digital DNA-DNA hybridization* (dDDH) (LEVETT; PICARDEAU, 2021). Vincent e colaboradores (2019) sugeriram, com base na utilização da ANI, uma nova divisão do gênero *Leptospira* em 368 espécies subdivididas em quatro subclados: P1 como patogênicas (n = 19), P2 como intermediárias (n = 21), S1 como saprófitas (n = 23) e S2 como um novo subclado de saprófitas (n = 5). Adicionalmente, nesse mesmo ano foi proposto por

Guglielmini e colaboradores, um conjunto de 545 loci altamente conservados como *Core-Genome* MLST – cgMLST capaz de definir com precisão espécies, clados, subclados, grupos clonais, bem como sorogrupos e sorovares antigenicamente relacionados (GUGLIELMINI et al., 2019). Recentemente, foram apresentadas mais quatro espécies, duas pertencentes ao grupo das saprofíticas agrupando-se no subclado S1 e duas pertencente ao grupo das patogênicas, alocadas no subclado P1 (KORBA et al., 2021).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é considerada a zoonose infectocontagiosa de maior distribuição geográfica no mundo (COSTA et al., 2015). Historicamente, é conhecida por ser uma doença ligada a ambientes rurais. Entretanto, grandes mudanças na epidemiologia dessa enfermidade foram observadas no Brasil desde as décadas de 50/60. A intensa migração da população rural para ambientes urbanos levou a um crescimento desordenado das cidades, favorecendo a instalação das novas comunidades em locais com problemas de saneamento básico (KO et al., 1999). Deficiências na coleta de lixo, na drenagem de esgoto e alta proliferação de animais sinantrópicos associados a fatores edafoclimáticos propiciaram que a leptospirose se tornasse endêmica e muitas vezes hiperendêmicas em grandes centros (KO et al., 1999; MS, 2010).

O risco de transmissão da leptospirose é influenciado por aspectos sociais, ambientais, demográficos, ocupacionais e comportamentais, os quais atuam diretamente no aumento da incidência e no surgimento de surtos da enfermidade (FELZEMBURGH et al., 2014). A ocorrência da leptospirose está especialmente relacionada a regiões de clima tropical, com temperaturas elevadas e períodos com alta pluviosidade. Em humanos, a transmissão é frequentemente associada a águas contaminadas, em sua maioria a atividades recreativas, como natação e/ou banhos em rios e lagos, ou após alagamentos e enchentes (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Costa e colaboradores, estimam que anualmente, em escala global, ocorram cerca de 1,03 milhão de novos casos com um número de mortes próximo a 59 mil (semelhante ao promovido pela raiva canina). Com relação ao custo econômico ligado à morbidade, a leptospirose gera perdas que são semelhantes às causadas por cisticercose e que chegam a ultrapassar a de outras doenças negligenciadas, como a leishmaniose, dengue e malária, o que deixa claro a sua importância em saúde pública (COSTA et al., 2015).

Humanos são considerados hospedeiros incidentais (quando infectados por cepas não adaptadas) enquanto animais podem ser tanto hospedeiros incidentais, quanto hospedeiros

crônicos (quando infectados por cepas adaptadas) (LEVETT, 2001). A manutenção da leptospirose em determinada região está associada à capacidade do agente induzir o estado de hospedeiros crônico em animais de várias ordens, através da sobrevivência nos tecidos hospedeiros. Tais animais são fontes constantes de contaminação do ambiente a partir da liberação contínua ou intermitente de bactérias através da urina (ELLIS, 2015). *Leptospira* spp. já foi descrita (isolamento ou detecção do DNA) em diferentes espécies de répteis (PAZ et al., 2019; RODAMILANS et al., 2020), anfíbios, aves (JOBINS; ALEXANDER, 2015) e mamíferos (ALMEIDA et al., 2019; COSTA et al., 2014; FARIA et al., 2008; PAZ et al., 2021b, 2021a; PAZ; HAMOND; PINNA, 2021, 2022; SANTOS et al., 2015). Esta última classe animal, desempenha maior importância epidemiológica por atuarem como hospedeiros de manutenção. Animais silvestres e domésticos podem atuar como portadores crônicos. Marsupiais, morcegos, raposas vermelhas, javalis, entre outros animais, destacam-se como hospedeiro de manutenção dos sorogrupos Australis, Sejroe, Grippotyphosa e Cynopteri em ambiente silvestre (BHARTI et al., 2003; MILAS et al., 2013). Por outro lado, em ambientes rurais, os caprinos, ovinos, bovinos, suínos e equinos são os principais hospedeiros de manutenção dos sorogrupos Serjoe, Pomona, Tarassovi, Australis (BHARTI et al., 2003; DIRECTOR et al., 2014; HAMOND et al., 2015a, 2015b).

Em áreas urbanas, animais sinantrópicos, especialmente *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), são os principais reservatórios do agente, destacando como hospedeiros de manutenção de *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae (COSTA et al., 2015; FARIA et al., 2008; KO et al., 1999; LOAN et al., 2015). Estudos anteriores mostraram o isolamento de leptospiros pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae em ambientes urbanos (inclusive no mesmo cenário epidemiológico) a partir de amostras de humanos, roedores (FARIA et al., 2008) e cães (PAZ et al., 2021a), e sugerem que a infecção nesses ambientes ocorra por contato direto ou indireto entre cães e roedores, particularmente *Rattus norvegicus*, em ambiente peridoméstico (PAZ et al., 2021a; TANGEMAN; LITTMAN, 2013; THOMÉ et al., 2014).

Os cães participam tanto do ciclo rural quanto do ciclo urbano, desempenhando um importante papel na epidemiologia da leptospirose (FONZAR; LANGONI, 2012). A infecção em animais susceptíveis ocorre através do contato direto ou indireto com urina ou tecidos de animais infectados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Assim, como em outras espécies animais, os sorovares infecciosos variam entre populações caninas de acordo com a exposição aos animais infectados (reservatórios selvagens ou domésticos) e região geográfica (BALBONI et al., 2020; LOFFLER et al., 2014). Historicamente, cães são considerados

hospedeiros de manutenção do sorovar Canicola (FEIGIN et al., 1973; ROJAS et al., 2010; ZACARIAS et al., 2008). Por outro lado, infecções incidentais têm sido relacionadas a cepas do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (LARSON et al., 2017; PAZ et al., 2021a; SUEPAUL et al., 2010). Estudos voltados ao isolamento e caracterização de leptospiras em cães são fundamentais para o esclarecimento da epidemiologia da doença. Entretanto, a literatura carece de trabalhos direcionados a essa finalidade. Dentre os isolados provenientes de cães naturalmente infectados, destacam-se aqueles pertencentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae (DI AZEVEDO et al., 2022; LARSON et al., 2017; MIRAGLIA et al., 2013; PAZ et al., 2021a), Djasiman (ROSSETTI et al., 2005), Canicola (MIRAGLIA et al., 2012; SUEPAUL et al., 2010) e Serjoe (MIOTTO et al., 2016).

Em ambientes urbanos, os cães enfrentam uma exposição significativa a leptospiras, devido ao alto contato com roedores e ambientes contaminados por fluídos (AWOSANYA et al., 2013; MORIKAWA et al., 2015). Presença de áreas alagadas, hábito de caçar, acesso à rua e alta precipitação pluviométrica são fatores de risco para a infecção canina nos diferentes cenários epidemiológicos (QUERINO et al., 2003; RAGHAVAN et al., 2012). A literatura destaca o sorogrupo Icterohaemorrhagiae como mais frequentemente encontrado em regiões tropicais (HAMOND et al., 2015b; LAVINSKY et al., 2012). Paz e colaboradores (2021a) demonstraram que cães infectados por *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae são capazes de eliminar leptospiras viáveis através da urina, oferecendo assim risco à saúde pública. O estudo da população canina visa o reconhecimento da leptospirose nesses animais como risco para a saúde pública devido à possibilidade de liberação intermitente das bactérias pela urina durante longos períodos no curso agudo e crônico da doença, sobretudo devido ao estreito convívio estabelecido entre o ser humano e esses animais (FONZAR; LANGONI, 2012; ROJAS et al., 2010; SYKES et al., 2011).

2.5 ANÁLISE GENÔMICA DE *LEPTOSPIRA* SPP

Os primeiros estudos genômicos de leptospiras foram publicados entre 2003 e 2004, e apresentaram o sequenciamento de cepas dos sorovares Lai e Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, espécie *Leptospira interrogans* (NASCIMENTO et al., 2004b; REN et al., 2003). Desde então, a genômica vem auxiliando o entendimento da interação bactéria-bactéria, bactéria-ambiente e bactéria-hospedeiro. No entanto, as bases moleculares para a patogênese da leptospirose permanecem pouco compreendidas (MURRAY, 2015). Atualmente, o gênero é composto de 68 espécies (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019;

KORBA et al., 2021; VINCENT et al., 2019) e conta com cerca de 1.200 genomas montados e depositados na base de dados do GenBank/NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Destes, aproximadamente 100 estão depositados como completos e são referentes a apenas oito espécies (*L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kmetyi*, *L. kobayashii*, *L. mayottensis*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. tipperaryensis*, *L. weilii* <acesso 24 de junho de 2022>) destacando a necessidade de estudos que visem avaliação molecular em escala genômica.

A identificação precisa das espécies circulantes tem implicações clínicas, de saúde pública, epidemiológicas, agrícolas, terapêuticas, para controle e prevenção da leptospirose. A recente redução no custo das análises usando tecnologias de sequenciamento de nova geração, associada aos avanços e desenvolvimento de *pipelines* de análise bioinformática, permitiu o sequenciamento de maior número de isolados de *Leptospira* em nível genômico, inclusive para regiões de baixa/média renda (AGAMPODI; VINETZ, 2021). Entretanto, a real circulação do agente permanece pouco conhecida mesmo em muitos países com alta ocorrência da enfermidade. O sequenciamento de isolados autóctones, além de favorecer uma identificação mais robusta, possibilita a obtenção de informações relacionadas à evolução e ao conhecimento de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, bem como genômica comparativa e funções atribuídas a determinados segmentos do genoma, como regiões gênicas regulatórias (FOUTS et al., 2016).

O genoma de *Leptospira* spp. consiste em dois cromossomos circulares, de aproximadamente 3.450.639 a 5.267.227 pares de bases e conteúdo GC de entre 38.27% e 42.39%. A quantidade média de genes varia de acordo com o subclado. P1, (composto pelas espécies patogênicas) possuem em média 3700 genes (GUGLIELMINI et al., 2019; VINCENT et al., 2019). O gênero *Leptospira*, particularmente a espécie *L. interrogans* sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, apresentam material genético altamente conservado, com poucas variações ao longo do tempo, e com formação de agrupamento geográfico distinto (SANTOS et al., 2018).

Fatores de virulência clássicos, são pouco frequentes em *Leptospira* spp.; isso ocorre devido à grande distância filogenética entre esse gênero e outros patógenos bacterianos bem estudados, o que indica uma provável existência de novos mecanismos de virulência exclusivos de leptospiros. Essa inferência é reforçada pela excessiva presença de genes anotados como proteínas hipotéticas dentre aquelas que compõe o grupo de genes específicos para leptospiros patogênicas (ADLER et al., 2011). Vincent e colaboradores (2019), observaram que cerca de um terço das proteínas são descritas como hipotéticas e que essas

podem representar resquícios de pseudogenes, anotação errada, ou ainda proteínas restritas ao gênero.

O aumento no número de *draft* de genomas publicados nos últimos anos tem favorecido expressivo avanço na taxonomia e entendimento a respeito da evolução das linhagens de *Leptospira* (saprófita, intermediária e patogênica) uma vez que esses estudos são focados nas principais diferenças entre as espécies (GUGLIELMINI et al., 2019; VINCENT et al., 2019). Por outro lado, a dinâmica intra-espécie bem como estudo de epidemiologia genômica que se proponha elucidar a interação e dispersão de *Leptospira* (espécies, sorogrupos e sorovares) em diferentes hospedeiros em um mesmo cenário epidemiológicos ainda são pouco descritos.

2.5.1 Montagem de genoma

A redução no custo do sequenciamento tem favorecido o seu uso rotineiro em análises microbianas em grande escala. No entanto, a obtenção de genomas completos ou, pelo menos, rascunhos de genoma com montagem e anotação de alta qualidade, ainda representa um grande desafio. A montagem de genomas é o processo de ordenação e orientação das leituras obtidas por NGS a fim de formar sequências maiores denominadas *contigs*. A junção de *contigs* em sequências maiores caracteriza a formação de *scaffolds* (MILLER; KOREN; SUTTON, 2010). Tal processo favorece a obtenção de genomas completos que é consideravelmente importante nos estudos de genômica comparativa, funcional e estrutural (BOSI et al., 2015). Em adição, quando bem montados, rascunhos do genoma conterão sequências e genes suficientes para permitir a realização de análises úteis. Toda via, a realização dessa tarefa é dificultada pela presença de alguns elementos, como por exemplo as regiões repetitivas (PAGE et al., 2016).

Diferentes técnicas laboratoriais têm sido descritas para a melhoria da qualidade da montagem de genomas. O uso de sequenciamento por capilar, voltado ao fechamento de lacunas (*gaps*), mapeamento óptico e montagens híbridas usando bibliotecas adicionais (leituras longas) são caracterizados como abordagens de maior acurácia para a montagem de genomas (CHOU et al., 2014; LANTZ et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2004a; PAGE et al., 2016). Em contrapartida, a adição dessas etapas é muitas vezes laboriosas e/ou acarreta custos adicionais (PAGE et al., 2016). Ferramentas e técnicas computacionais, como ordenamento de *contigs*, *scaffolding*, fechamento de *gaps*, além da identificação e correção de erros de base e de montagem, são frequentemente utilizadas para a melhoria da qualidade da

montagem de genomas. O uso sequencial e combinado de programas tem favorecido a melhoria da qualidade final da montagem (DE SÁ et al., 2016).

Apesar do considerável acréscimo nos últimos anos, a disponibilidade de genomas de leptospiras é focado basicamente em duas espécies patogênicas (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*); juntas elas compõem cerca de metade dos genomas depositados no banco de dados do GenBank. Adicionalmente, a falta de genomas de referência para todas as espécies e sorogrupos, bem como a baixa qualidade dos *drafts* disponíveis (PAGE et al., 2016), comprometem etapas essenciais dos estudos de comparação genômica no gênero *Leptospira*, o que torna necessário o desenvolvimento de técnicas e metodologias para o melhoramento das análises pós sequenciamento.

2.5.2 Caracterização de genes de virulência

A caracterização de genes responsáveis pela adaptabilidade e virulência das leptospiras são de fundamental importância para o entendimento da sua manutenção nos diferentes ambientes e da patogênese da enfermidade (PICARDEAU, 2017b). Nos últimos anos, o aumento da disponibilidade de *drafts* de sequências genômicas de diferentes espécies de *Leptospira*, associado ao desenvolvimento das técnicas de manipulação genética, possibilitaram a identificação de diferentes fatores de virulência (MURRAY, 2015; WUNDER; ESHGHI; BENAROUDJ, 2018). Entretanto, devido ao número limitado de ferramentas genéticas voltadas a espiroquetas, o entendimento dos mecanismos de patogenicidade, em especial os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento do estado de portador renal, ainda carece de mais estudos, uma vez que muitos deles permanecem completamente desconhecidos (MURRAY, 2015). O conteúdo gênico de uma sequência varia consideravelmente entre as espécies de diferentes clados (VINCENT et al., 2019). Em adição, já foi descrito a ocorrência de variação no número e padrão de genes em cepas de um mesmo sorovar (PICARDEAU, 2015). Zhang e colaboradores (2020) demonstraram que duas cepas do sorogrupo Canicola (cepa 611 e LJ178) possuem respectivamente, 140 e 131 genes exclusivos, destacando assim a necessidade da avaliação do conteúdo gênico de cada cepa. Fouts e colaboradores (2016) descreveram a presença de genes capazes de sintetizar fatores de virulência envolvidos em diferentes processos da infecção, além de sequências responsáveis pela adaptação nos mais variados ambientes. Adicionalmente, outros estudos destacam ainda a presença de genes responsáveis por

resistência a antimicrobianos, como por exemplo *czcA*, *czcC*, *tetA*, *ermA*, *norM*, *mdtA* e *qacA* (MORENO et al., 2016, 2018b; VORONINA et al., 2014).

Um dos fatores que mantém a sobrevivência das leptospiras no meio ambiente é a capacidade de formarem biofilmes (THIBEAUX et al., 2020). Biofilmes são matrizes de substâncias exopoliméricas (EPS) constituídas principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, que são produzidas pelas bactérias para promover adesão às superfícies e garantir sua própria sobrevivência no ambiente e hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Leptospiras são capazes de formar biofilme *in vitro* (KUMAR et al., 2016a; RISTOW et al., 2008), *in vivo* (SANTOS et al., 2021a) e em ambientes naturais (KUMAR et al., 2016b; SINGH et al., 2003). Essas estruturas, muitas vezes, podem favorecer a infecção e desempenhar importante papel na manutenção dessas bactérias no ambiente, evitando principalmente a sua dessecação (RISTOW et al., 2008; SANTOS et al., 2021a; THIBEAUX et al., 2020). No entanto, as vias responsáveis pela formação de biofilme são pouco compreendidas em leptospiras, especialmente em cepas recuperadas a partir de infecções naturais.

Guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica (c-di-GMP) é um segundo mensageiro presente em procariotos e relacionado como um elemento central de regulação de diferentes respostas celulares. Responsável por vários processos, como produção de biofilme, adaptação ao ambiente externo, produção de fatores de virulência e motilidade, o c-di-GMP é sintetizado pela enzima diguanilato ciclase (DGC) contendo o domínio GGDEF e hidrolisado por fosfodiesterases específicas (PDEs), que contêm domínios EAL e HD-GYP (HENGGE, 2009; JENAL; REINDERS; LORI, 2017; RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). O conhecimento a respeito da interação de c-di-GMP em leptospiras ainda é limitado, entretanto, Xiao e colaboradores (2018) identificaram 25 proteínas que podem estar envolvidas no metabolismo de c-di-GMP em *L. interrogans* sorovar Lai cepa 56601. Recentemente, com a utilização de quatro mutantes de *L. interrogans*, sorogrupo Pyrogenes, sorovar Manilae, foi demonstrado que c-di-GMP intracelular desempenha importante função no controle da formação de biofilme e na motilidade de leptospiras (THIBEAUX et al., 2020).

3 HIPOTESE

Cepas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães, roedor e humano, em um mesmo cenário epidemiológico, apresentam alto grau de similaridade e conteúdo gênico, compartilhando genes relacionados à patogênese da doença, incluindo a formação de biofilme.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar cepas autóctones de *Leptospira interrogans* obtidas a partir de amostras de cães naturalmente infectados e roedor com a cepa de referência L1-130, obtida a partir de amostras de humanos.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Obter sequências do genoma de cepas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, oriundas de amostras de cães naturalmente infectados e com sintomatologia clínica de leptospirose;

Montar e realizar a anotação funcional de genes e os produtos gênicos de genomas de *L. interrogans*;

Realizar a comparação do genoma de *L. interrogans* isoladas a partir de amostras de cães, humano e roedor, a fim de obter informações sobre genes relacionados à patogênese, incluindo a formação de biofilme.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DAS CEPAS DE LEPTOSPIRAS E EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foram incluídos neste estudo 4 isolados (Tabela 1) de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Tais cepas pertencem à coleção de culturas de *Leptospira* spp. do banco de cepas de agentes bacterianos do Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal da Bahia (LABAC-UFBA) e foram isoladas a partir de amostras de sangue ou urina de cães naturalmente infectados e com sintomatologia clínica, cujo quadro e desfecho (post mortem) da enfermidade foram bem caracterizados (PAZ et al., 2021a).

Tabela 1 - Resumo sobre a origem e caracterização prévia das cepas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isolados na cidade de Salvador, Bahia – Brasil, e inclusas neste estudo

Identificação Animal	Origem do Isolado	MAT Ponto corte (100)	Caracterização Sorológica	Caracterização Molecular	Data de coleta
		Título/sorogrupo	Sorogrupo/Sorovar		
C20	Sangue Total	Título - 400 Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	<i>L. interrogans</i>	03.07.13
C29	Urina	Título - 200 Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Inconclusivo	<i>L. interrogans</i>	16.12.13
C51	Sangue Total	Negativo	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Inconclusivo	<i>L. interrogans</i>	07.07.15
C82	Sangue Total	Título – 400 Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. ND	<i>L. interrogans</i>	26.02.18
Fiocruz L1130*	Sangue Total	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	<i>L. interrogans</i>	1996
Fiocruz R062*	Parênquima Renal	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	Sg. Icterohaemorrhagiae Sv. Copenhageni	<i>L. interrogans</i>	1968

ND = não determinado; Fonte: adaptada de Paz e colaboradores (2021a); Sg (Sorogrupo), Sv (sorovar);

*= cepas isoladas em outros estudos.

Brevemente, a extração de DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando-se o kit QIAamp DNA minikit® (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA foi medida por espectrofotometria com o sistema Nanodrop (Thermo Scientific, DE, EUA). As cepas foram primeiramente tipificadas em nível

de sorogrupo e sorovar presuntivo através da técnica de aglutinação microscópica com anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais (mAbs) no Centro de Referência Nacional para Leptospirose (CRNL), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Posteriormente, as cepas foram submetidas a análise do número variável de sequências repetitivas em tandem (VNTR), destinada à avaliação do sorovar presuntivo, e em seguida submetidas ao sequenciamento do gene *rrs* (16S) e *secY* para identificação de gênero e espécie, respectivamente (PAZ et al., 2021a). Em adição, foram baixados os arquivos do tipo FASTA dos cromossomos 1 e 2 (Número de acesso: NC005823 e NC005824) da cepa de referência *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni, cepa L1-130, obtida a partir de amostra de sangue de humano, (NASCIMENTO et al., 2004a), e os arquivos brutos (dados de leituras pós-sequenciamento – número de acesso SRA SRX1274269) do isolado *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni, cepa Fiocruz R062, obtidos a partir de amostras de rim de roedor (SANTOS et al., 2018), ambas provenientes da cidade de Salvador.

5.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS DADOS BRUTOS

As amostras foram sequenciadas no *National Veterinary Services Laboratories* (NVSL, APHIS – USDA), Ames, Iowas, U.S. A concentração do DNA genômico reconstituído foi determinada usando o Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit para garantir que houvesse no mínimo 1 ng/μl para sequenciamento. As bibliotecas foram preparadas usando o Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.), e o sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina™ MiSeq (MiSeq Desktop Sequencer) com leituras curtas (*shorts reads*) do tipo *paired-end*, com fragmentos de 2 x 250 pares de bases (pb).

A qualidade do sequenciamento foi avaliada com auxílio do programa FastQC 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Dentre os parâmetros avaliados, estão: o número de leituras, tamanho médio das leituras, média da profundidade, média da qualidade das leituras através do valor de qualidade Phred (Phred *score*) e o conteúdo GC. Ainda, a cobertura estimada do sequenciamento (cobertura teórica) foi obtida com base na equação de Lander e Waterman ($C = LN / G$) considerando o total de leituras (L), o comprimento médio das leituras (N) e o tamanho esperado do genoma (G) (LANDER; WATERMAN, 1988; SIMS et al., 2014).

5.3 MONTAGENS, ANOTAÇÃO E ANÁLISE DOS GENOMAS

Para a montagem *ab initio* dos genomas, foi desenvolvida a construção de *pipeline* que possibilitasse a melhora da qualidade final. Inicialmente, os genomas foram montados utilizando-se cinco programas diferentes Skesa v.2.4.0 (SOUVOROV; AGARWALA; LIPMAN, 2018), SPAdes v.3.15.3 (BANKEVICH et al., 2012), SOAPdenovo2 v.2.40 (LUO et al., 2012), Unicycler v.0.4.8 (WICK et al., 2017) e Velvet v.1.2.10 (ZERBINO; BIRNEY, 2008), a fim de selecionar o(s) programa(s) mais adequado(s). A qualidade resultante das cinco montagens foi avaliada utilizando o programa Quast v.5.0.2 (GUREVICH et al., 2013). A porcentagem de cobertura da montagem com relação ao genoma de referência, o número de *contigs* (menor número), o tamanho do maior *contig*, bem como o N50, NG50, L50 e o LG50 foram selecionados como parâmetros comparativos da qualidade das montagens. Após a avaliação e escolha do melhor resultado, esse foi submetido ao *pipeline* de melhoria pós-montagem proposto por Page e colaboradores (2016). O *scaffolding* do genoma (processo de ordenar e orientar *contigs*) foi realizado pelo MEDUSA v.1.6 (*Multi-Draft based Scaffolder*) (BOSI et al., 2015) utilizando como referência o genoma da *L. interrogans*, sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sorovar *Copenhageni*, cepa L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004a) (Número de acesso: NC005823 e NC005824). Para o fechamento dos *gaps* gerados no processo anterior, foram testados os programas FGAP v.1.8.1 (FG) (PIRO et al., 2014), GapCloser v.1.0.3 (GC) (XU et al., 2020), Abyss_Sealer v.2.3.1 (AS) (<https://github.com/bcgsc/abyss/tree/master/Sealer>) e GapBlaster v.1.1.2 (GB) (DE SÁ et al., 2016). Primeiro, foi avaliada a eficiência individual de cada um dos programas, em seguida testamos a associação de Fgap + GapBlaster como sugerido por De Sá e colaboradores (2016). O *pipeline* foi testado e validado através da montagem de 10 sequências de *Leptospira interrogans*, escolhidas de forma aleatória, que faziam parte de trabalhos anteriores (GUGLIELMINI et al., 2019; SANTOS et al., 2018) e foram submetidas e publicadas no *Sequence Read Archive* (SRA-GenBank).

A anotação dos genomas foi realizada utilizando o *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) do NCBI (TATUSOVA et al., 2016) e pela ferramenta *online Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (AZIZ et al., 2008). A fim de padronizar os dados provenientes da anotação, uma nova análise junto ao PGAP foi realizada para a cepa de referência (*Copenhageni* L1-130). Profagos e elementos semelhantes a fagos foram identificados usando a ferramenta *online* PHASTER (ARNDT et al., 2016; BERTELLI et al., 2017). Repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas agrupadas (*Clustered*

regularly inter-spaced short palindromic repeats - CRISPRs) e regiões Cas foram preditas pela ferramenta CRISPRCas-finder (COUVIN et al., 2018).

A avaliação da presença de sequências envolvidas no metabolismo de c-di-GMP, foi baseada na análise do genoma de *L. interrogans* cepa Lai descrita anteriormente por Xiao e colaboradores (2018). Foram separadas as 25 sequências de nucleotídeos e aminoácidos preditas de gerarem proteínas contendo domínios GGDEF, EAL ou HD-GYP (13 proteínas de domínio GGDEF, 5 proteínas de domínio EAL, 3 proteínas de domínio GGDEF-EAL e 4 proteínas de domínio HD-GYP). As sequências dos genes e das proteínas ortologas de cada um dos isolados (C20, C29, C51, C82, L1-130 E R062), foram recuperados e comparadas através do alinhamento múltiplo de sequencias usando o ClustalW.

5.4 CHAMADA DE VARIANTES

Para identificação dos Polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs), a chamada de variantes foi realizada com o auxílio do *pipeline* Snippy v4.4.03. Resumidamente, as leituras brutas (arquivos SRA) pertencentes a 63 isolados da espécie *L. interrogans*, sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sorovar *Copenhageni* obtidos em diferentes regiões e provenientes de cães, humanos e roedores foram mapeadas contra o genoma de referência de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni*, cepa L1-130 usando BWA-MEM v0.7.12 (LI; DURBIN, 2009). Os SNPs foram posteriormente identificados com auxílio do programa Freebayes v1.1 com a configuração de parâmetros padrão. As variantes foram posteriormente anotadas usando SnpEff v4.3 (CINGOLANI et al., 2012).

5.5 IDENTIDADE MÉDIA DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE DE FILOGENIA

Inicialmente, o gene *ppk*, que codifica uma polifosfato quinase (720 aminoácidos), foi utilizado para observar a relação entre as sequencias dos isolados de cães, isolado de humano e de roedor e das espécies que compõe o subclado P1 (antigo clado das patogênicas). A análise filogenética foi realizada com o programa Mega v6 usando o método de *Neighbor Joining*; a árvore filogenética foi construída usando o modelo de Tamura-Nei (TAMURA et al., 2013). Em seguida, uma avaliação filogenética mais robusta entre as sequências dos cães, humano e roedor, e sequências de todas as espécies de *Leptospira* spp. foi realizada por meio

da análise da identidade média de nucleotídeo (*Average Nucleotide Identity* - ANI) usando pyani v. 0.2.7 (PRITCHARD et al., 2016). Posteriormente, uma nova análise foi realizada englobando os genomas dos isolados aqui estudados e um genoma de cada espécie do subclado P1, disponíveis no GenBank. Informações sobre os genomas utilizados nesse trabalho podem ser encontradas no Anexo b (Tabela Suplementar 2).

Na análise filogenética construída com base no polimorfismo de nucleotídeo único em sequências concatenadas (*core-SNPs*), as mesmas foram alinhadas e então filtradas usando Gubbins (CROUCHER et al., 2015). A árvore filogenética foi gerada utilizando o método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) no programa RAxML (STAMATAKIS, 2014). Para tal, foi aplicado o modelo GTR com distribuição gama de substituição de nucleotídeos, com a análise de *bootstrap* com 1000 réplicas para calcular o suporte estatístico dos ramos das árvores. Visualização e edição da árvore foi realizada com a versão web do programa FigTree v4.

5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS

A análise comparativa dos genomas foi realizada através do alinhamento e ordenação das sequências obtidas utilizando o Mauve (DARLING; MAU; PERNA, 2010) e por construção de gráficos de sintenia com auxílio do programa ACT (*Artemis Comparison Tool*) (CARVER et al., 2005). Por fim, o programa BRIG (*BLAST Ring Image Generator*), que realiza comparações entre genomas por meio do algoritmo BLAST, foi utilizado para gerar as imagens de comparação circular dos genomas dos cromossomos (I e II). As imagens geradas pelo BRIG mostram a semelhança e/ou diferenças entre uma sequência de referência (círculo central) e outras sequências. Os isolados descritos nesse trabalho foram confrontados com o genoma de referência de *L. interrogans* cepa L1-130, pertencente ao mesmo sorogrupo e sorovar. A comparação é representada como um conjunto de anéis concêntricos onde as diferenças são representadas como *gaps*. Ainda, o percentual de identidade entre as sequências é informado através de uma escala indicativa (ALIKHAN et al., 2011).

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE INICIAL DOS GENOMAS

Os dados individualizados da qualidade do sequenciamento estão descritos na Tabela 2. Após análise dos arquivos das sequências de *Leptospira interrogans* observou-se que o número de leituras variou entre 1.679.526 para a amostra C20 e 3.268.364 para a amostra C51, e o tamanho médio das leituras ficou entre 216,65 e 228,95 para as amostras C51 e C29 respectivamente. A menor profundidade foi de 81,9X para a amostra C20, enquanto C51 demonstrou profundidade de 153X. A média da qualidade das leituras (Phred score = 37) ficou semelhante em todas as amostras.

Tabela 2 - Descrição da qualidade do sequenciamento de isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectados

Parâmetros	Amostras				
	C20	C29	C51	C82	R062 ¹
Número de leituras	1.679.526	2.335.240	3.268.364	3.021.564	3.799.599
Tamanho médio das leituras (pb)	225,5	228,95	216,65	223,3	75
Média da profundidade	81,9	115,5	153,0	145,8	61,58
Média da qualidade das leituras	37,35	37,45	37,60	37,60	39,00

¹Cepa isolada de roedor capturado no mesmo cenário epidemiológico. Os dados de sequenciamento (número de acesso SRX1274269) foram descritos por Santos e colaboradores (2018)

6.2 MONTAGENS E ANOTAÇÃO

O melhor resultado de montagem foi obtido com o programa SPAdes v.3.15.3, o qual foi então escolhido para as etapas subsequentes de finalização de montagem. Os resultados dos montadores Skesa v.2.4.0 e Unicycler v.0.4.8 apresentaram o segundo e terceiro melhor resultado, respectivamente, e foram então utilizados para auxiliar no fechamento de *gaps* (anexo a - Tabela Suplementar 1). Após uso do SPAdes, associado ao *pipeline* de melhoria, foi observado que em todas as amostras a cobertura frente ao genoma de referência ficou acima de 99%, a profundidade do sequenciamento ficou entre 81 (C20) e 153 (C51), com o número de *contigs* de 79, 66, 69 e 67 para as amostras C20, C29, C51 e C82, respectivamente. Os dados de N50 e NG50, bem como de L50 e LG50 foram semelhantes entre as amostras e podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais parâmetros referentes a qualidade da montagem de genoma de isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectados

Parâmetros	Amostras				
	C20	C29	C51	C82	R062 ¹
Estatística do genoma					
Cobertura (%) ²	99,13	99,19	99,08	99,22	98,18
Comprimento do alinhamento ³	4.589.593	4.593.305	4.587.698	4.595.108	4.544.255
Mapeamento de leituras					
Número de leituras mapeadas	1.679.885	2.336.766	3.269.025	3.020.653	3.789.767 ⁴
Leituras mapeadas (%)	99,80	99,87	99,83	99,86	94,31 ⁴
Profundidade de cobertura	81	116	153	145	62,4 ⁴
Estatística da montagem					
Número de <i>contigs</i> ⁵	79	66	69	67	121
Tamanho do maior <i>contig</i>	350.198	350.268	350.244	417.526	207.319
Comprimento total das leituras	4.591.570	4.595.269	4.592.982	4.599.081	4.546.018
N50 ⁶	105.577	184.145	159.646	136.571	64.545
L50 ⁷	12	9	9	10	21
NG50 ⁸	105.577	133.434	159.646	136.571	63.768
LG50 ⁹	12	10	9	10	22
GC (%) ¹⁰	35,01	35,00	35,02	35,01	34,97

¹ R062 sequência de roedor isolada no mesmo cenário epidemiológico (número de acesso: SRX1274269); ²Cobertura baseada no genoma de referência *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa L1-130 (número de acesso: NC005823 e NC005824) (NASCIMENTO et al., 2004a); ³Comprimento da sequência de referência 4.627.366 bp; ⁴Dados obtidos no manuscrito (SANTOS et al., 2018); ⁵Toda estatística é baseada no tamanho mínimo de 500 bp para os *contigs* (padrão); ⁶N50 é o comprimento da sequência do menor *contig* que cobre 50% do comprimento total do genoma (montado); ⁷L50 é a contagem do menor número de *contigs* cuja soma de comprimento representa a metade do tamanho do genoma (montado); ⁸NG50 é o tamanho do menor *contig* que compõe 50% do comprimento (estimado) do genoma de referência; ⁹LG50 é a contagem do menor número de *contigs* que constituem 50% do comprimento (estimado) do genoma de referência; ¹⁰GC (%) da referência = 35,04.

O processo de *scaffolding* (MEDUSA v.1.6) permitiu a obtenção de dois *scaffolds* com tamanhos semelhantes aos cromossomos 1 e 2 de *Leptospira* spp. Além destes, foi observada a presença de *contigs* menores cuja quantidade variou entre as amostras (Tabela 4). É importante salientar que a presença de *gaps* só foi observada no *scaffold* que corresponde ao cromossomo 1. O processo de *scaffolding* permitiu a redução do número de sequências (*scaffolds* e *contigs*) de 79 para 4 na amostra C20, de 66 para 3 na amostra C29, de 69 para 12 na amostra C51, e de 67 para 8 na amostra C82 (Tabela 4).

Os *scaffolds* maiores (representantes dos cromossomos 1 e 2) foram então direcionados à etapa de fechamento de *gaps*. A associação dos programas Fgap v.1.8.1 e GapBlaster v.1.1.2 permitiram a melhor performance nessa etapa. O maior número de *gaps* fechados foi para o genoma da amostra C29 (n = 29), seguido da amostra C82 (n = 28), C20 (n = 27) e C51 (n = 24). Após essa etapa, as sequências remanescentes foram submetidas à análise de comparação com o banco de dados do GenBank, utilizado o BLAST. Foi observado que tais sequências eram referentes a outros microrganismos e demonstraram

similaridades entre 89 e 100% com Influenzavírus A, *Mycobacterium tuberculosis*, e novo coronavírus (SARS-CoV-2) (Tabela 4).

Tabela 4 - Informações a respeito do processo de *scaffolding* e fechamento de *gaps* de genomas de isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães e roedor naturalmente infectados

Parâmetros	Amostras				
	C20	C29	C51	C82	R062
Número de <i>contigs</i> após montagem	79	66	69	67	121
Número de <i>contigs</i> após Medusa ¹	4	3	12	8	3
Número de <i>gaps</i> após Medusa	45	41	39	38	65
Número de <i>gaps</i> após uso do Fg+Gb	18	12	15	10	22
Número de <i>contigs</i> não mapeados ²	2	1	10	6	1

¹ Após uso do programa medusa, todas as montagens apresentaram dois *contigs* maiores correspondentes aos cromossomos 1 e 2 e vários *contigs* menores que alinharam com o genoma de *Leptospira* spp. e outras espécies;

² *Contigs* que não mapearam e ao usar o BLAST foram caracterizados como sequências diferentes de *Leptospira* spp.

Todas as amostras demonstraram, quando comparadas à cepa L1-130, quantidade semelhante no total de genes e CDSs, bem como de genes codificantes e CDSs com função definida “com proteínas” (Tabela 5). Entretanto, a amostra C29 demonstrou um aumento discreto nos números de genes e CDSs.

Tabela 5 - Parâmetros referentes à anotação de genoma de isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectado, humano e roedor

Parâmetro	L1-130 ¹	C20	C29	C51	C82	R062 ²
Genes (total)	3.733	3.729	3.918	3.738	3.740	3.704
CDSs (total)	3.689	3.687	3.876	3.696	3.698	3.662
Genes (codificante)	3.602	3.602	3.782	3.614	3.609	3.584
Genes com função definida	2.663	2.660	2.817	2.663	2.661	2.649
Genes hipotéticos	939	942	965	951	948	935
Genes (RNA)	44	42	42	42	42	42
rRNAs ³	1, 2, 2	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1
rRNAs completos	1, 2, 2	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1
TRNAs	37	37	37	37	37	37
NcRNAs	2	2	2	2	2	2
Pseudogenes (resíduos ambíguos)	0 de 87	0 de 85	0 de 94	0 de 82	0 de 89	0 de 78
Pseudogenes (<i>frameshifted</i>)	70 de 87	52 de 85	56 de 94	49 de 82	53 de 89	53 de 78
Pseudogenes (incompleto)	14 de 87	36 de 85	37 de 94	36 de 82	39 de 89	27 de 78
Pseudogenes (parada interna)	29 de 87	19 de 85	26 de 94	20 de 82	20 de 89	19 de 78
Pseudogenes (problemas)	23 de 87	18 de 85	21 de 94	19 de 82	20 de 89	18 de 78
Arranjos CRISPR	-	2	2	2	2	2

¹ cepa L1-130 (número de acesso: NC005823 e NC005824); ² Cepa R062 (número de acesso: SRX1274269) ³ Os números correspondem aos rRNA 5S, 16S e 23S respectivamente.

A anotação gerada pelo servidor RAST categorizou de forma funcional as CDSs de cada um dos isolados em 226 subsistemas. O número de CDSs cobertas variou entre 916 e 964 para os isolados C51 e C29, respectivamente. Dentre os subsistemas, metabolismo de

aminoácidos e derivados foi o mais abundante com números que variaram entre 166 e 174, seguidos por CDSs relacionadas com cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos com 121 CDSs em todos os isolados, exceto no C29 (125). É importante destacar foi observado um maior número de genes relacionados a formação da parede celular e cápsula na cepa C20 (n=30) quando comparado com as demais (n=18). A distribuição do subsistema de CDSs previstos em cada uma das cepas podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição do número de funcionalidades em cada subsistemas em genomas de cepas de *L. interrogans* obtidas em a partir de amostras de cães, humano e roedores em um mesmo cenário epidemiológico

Subsistema	Número de funcionalidades					
	C20	C29	C51	C82	L1 130	R062
Cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	121	125	121	121	121	121
Parede celular e cápsula	18	30	18	18	18	18
Virulência, doença e defesa	18	20	18	18	18	18
Metabolismo de potássio	5	5	5	5	5	5
Fagos, Profagos, Elementos transponíveis, Plasmídeos	1	1	1	1	1	1
Transporte de membrana	20	22	20	20	20	20
Aquisição e metabolismo de ferro	1	1	1	1	1	1
Metabolismo do RNA	27	28	27	27	28	27
Nucleosídeos e nucleotídeos	32	32	32	32	32	32
Metabolismo de proteínas	97	97	94	97	95	95
Divisão celular e ciclo celular	4	4	4	4	4	4
Motilidade e quimiotaxia	73	77	73	73	73	73
Regulação e sinalização celular	29	29	29	30	30	29
Metabolismo secundário	4	4	4	4	4	4
Metabolismo do DNA	57	64	57	57	57	57
Ácidos graxos, lipídios e isoprenóides	31	31	31	31	31	31
Metabolismo do nitrogênio	7	7	7	7	7	7
Dormência e esporulação	2	2	2	2	2	2
Respiração	54	54	54	54	54	54
Resposta ao estresse	54	55	54	54	54	54
Metabolismo de Compostos aromáticos	5	5	5	5	5	5
Aminoácidos e derivados	166	174	166	166	167	166
Metabolismo do enxofre	5	5	5	5	5	5
Metabolismo do fósforo	11	11	11	11	11	11
Carboidratos	65	69	65	65	65	65
Diversos	12	12	12	12	13	12
Nº de CDSs cobertas	919	964	916	920	921	917

A análise PHASTER mostrou que nenhum profago intacto estava presente nos genomas das cepas estudadas. Entretanto, foi observada a presença de diferentes profagos caracterizados como “incompleto” que variavam entre 6,1 kb e 11,4 kb (Anexo c - Tabela Suplementar 3). O número de arranjos de CRISPR, variaram entre os isolados; C20 e R062 apresentaram 10 arranjos cada, C29, C51 e C82 9 arranjos cada e L1-130 com 11 arranjos. Em adição, é possível notar que pares de sequencias idênticas foram observadas em todos os isolados. Baseada o na presença de proteínas de assinatura Cas, foi identificado que apenas

um subtipo de CRISPR (CAS-TypeIC) nos genomas dos isolado (Anexo d -Tabela Suplementar 4).

6.2.1 Análise dos genes de virulência

Após a retirada dos genes repetidos, foi observado que todos os isolados apresentaram praticamente o mesmo número de regiões codificantes e os mesmos produtos encontrados na anotação realizada para a cepa de referência L1-130. As únicas diferenças notadas foram a presença de proteína da família enoil-coA hidratase (presente na L1-130, R062, C20, C29 e C82, e ausente na C51), ATPase transportadora de potássio (presente na L1-130, R062, C20, C29 e C82, e ausente na C20 e C29), genes flavina redutase, sequências de inserção (IS3, IS1500A) e lipoproteína com função de adesina (*ligB*) (presente na cepa de referência, e ausente na cepa de roedor R062 e nos isolados) e a presença de uma lipase apenas na cepa proveniente de roedor.

Observamos, em todas as sequências, a presença de genes responsáveis pela síntese de diversas lipoproteínas (*lenA*, *lipL21*, *lipL31*, *lipL32*, *lipL36*, *lipL41*, *lipL45*, *lipL46*, *lipL71* e *lola*), bem como responsáveis pela formação do complexo do motor flagelar (*flaA*, *fliG*, *fliM*, *fliN*), e para resistência a antimicrobianos e resistência a metais pesados (*tetA*, *cusA/czcA*).

O número de proteínas hipotéticas presentes no genoma dos isolados caninos e do roedor foi semelhante ao encontrado no genoma da cepa de referência. De forma semelhante ao observado para os genes com função definida, o isolado C29 apresentou uma pequena elevação no número de genes hipotéticos. Cabe ressaltar que cerca de um terço das sequencias codificantes em *Leptospira* spp. são anotadas como proteínas hipotéticas e a essas não são atribuídas categorias funcionais (Tabela 5).

Observamos a presença de 12 proteínas com domínio GGDEF, cinco proteínas com domínio EAL, duas proteínas com domínio GGDEF-EAL e quatro proteínas com domínio HD-GYP nas cepas provenientes de cães (C20, C29, C51, C82), humanos (L1-130) e roedor (R062) que podem estar envolvidas no metabolismo de c-di-GMP. Mutações foram observadas em 20 das 23 sequências de nucleotídeos encontradas. Entretanto, em apenas sete sequências tais mutações causaram mudanças nas cadeias de aminoácidos e conseqüentemente na sequência final da proteína. A identificação das sequências, bem como o número e o sítio de cada uma das mutações podem ser observados no Anexo e -Tabela Suplementar 5.

6.3 CHAMADA DE VARIANTE

Em relação à sequência de referência (L1-130), a análise de chamada de variante identificou um total de 147, 141, 126, 143 e 112 de variantes para os isolados C20, C29, C51, C82 e R062, respectivamente. O número de mutações *missense* variou de 33 na R062 a 38 na C20. Enquanto o número de mutações sinônimas detectadas ficou entre 4 e 10. Os dados detalhados são mostrados na Tabela 7. A maioria das mutações estão presente em regiões não codificante ou em regiões de proteínas hipotéticas. Dentre as mutações presentes em regiões conhecidas, destaca-se aquelas observadas nas sequências responsáveis pela síntese de uma proteína contendo domínio de adenilato/guanilato ciclase, presente em todas as sequências, e uma mutação sinônima presente na sequência responsável pela síntese do gene *secY*, presente nos isolados C20, C29, C82 e R062.

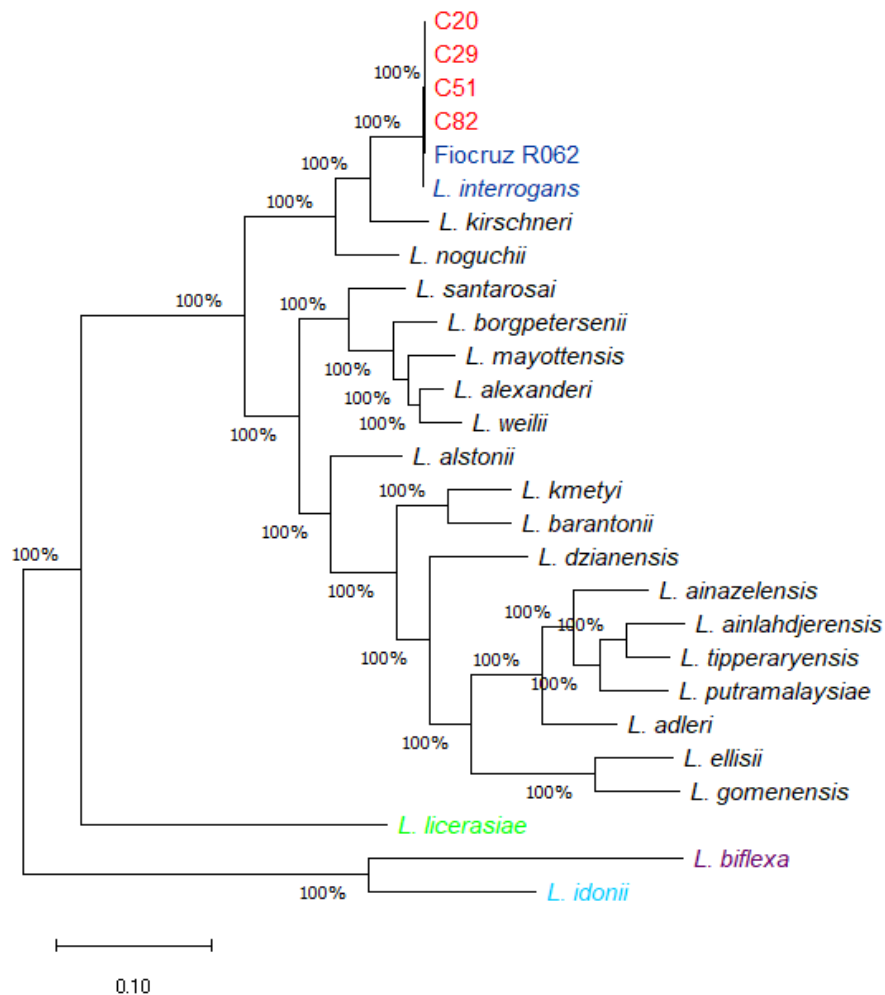
Tabela 7 – Análise de variantes no genoma de leptospiros isoladas a partir de amostras de cães e roedores provenientes da cidade de Salvador – Bahia, Brasil

Tipo de variante	Cepa avaliada				
	C20	C29	C51	C82	R062
Variante complexa	20	19	20	20	13
Deleção	23	18	17	21	14
Inserção	41	42	37	40	34
MNP	1	1	0	1	1
SNP	62	61	52	61	50
Total de variantes	147	141	126	143	112
<i>Missense</i>	38	34	36	36	33
<i>Sinônima</i>	4	10	4	5	7

6.4 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

As análises direcionadas ao gene *ppk* revelaram que todos os genomas do presente estudo se agrupam no subclado P1 e formam um ramo monofilético com a sequência da espécie patogênica *Leptospira interrogans*. A árvore filogenética gerada (Figura 1) revela a relação evolutiva e genética entre as sequências aqui estudadas e sequências das espécies patogênicas (subclado P1).

Figura 1 - Árvore filogenética construída com sequências do gene *ppk* para avaliar a relação entre as cepas do presente estudo e as 19 espécies de *Leptospira* que compõem o subclados P1 (antigo clado das espécies patogênicas). Sequências obtidas diretamente de amostras clínicas de cães estudadas neste trabalho são indicadas em vermelho, sequências obtidas de humano e roedor, na mesma região, estão em azul, sequências de outras espécies do subclado P1 estão indicadas em preto. Ainda, foram adicionadas sequências de cepas do subclados P2 (verde), S1 (roxo) e S2 (marrom). A análise foi feita pelo método de máxima verossimilhança (modelo evolutivo de Tamura-Nei). O suporte para a ordem de ramificação foi determinado pelo cálculo do *bootstraps* com 1000 réplicas. Os números de acesso das sequências podem ser encontrados no Anexo b (Tabela Suplementar 2).



Inicialmente, os valores da ANI foram avaliados usando o genoma de todas as 68 espécies de leptospiros descritas (Figura 2). Foi observado que as cepas analisadas no presente estudo pertenciam ao subclado P1, com elevada similaridade com a espécie *Leptospira interrogans*. Posteriormente, tais cepas foram confrontadas com o genoma das espécies pertencentes ao subclado P1 (Figura 3). Observamos alto grau de similaridade com o genoma da cepa de referência L1-130. Foram observados valores de identidade de 99.44% com C20; 99.96% com C29; 99.95% com C51 e R062 e 99.97% com C82, confirmando que essas pertencem à espécie *Leptospira interrogans* (Anexo f - Tabela Suplementar 6).

Figura 2 - Representação gráfica da matriz da identidade média de nucleotídeos (ANIb) entre os genomas das cepas do presente estudo e as sequências de 68 espécies do gênero *Leptospira*. Observa-se a separação dos clados onde tons cinza representa valores >70%, tons de azul significam valores <95%, branco representam 95%, e tons de vermelho >95%. A seta indica o nó onde descendem as espécies patogênicas (Subclado P1) mais frequentemente envolvidas em doenças de humanos e animais.

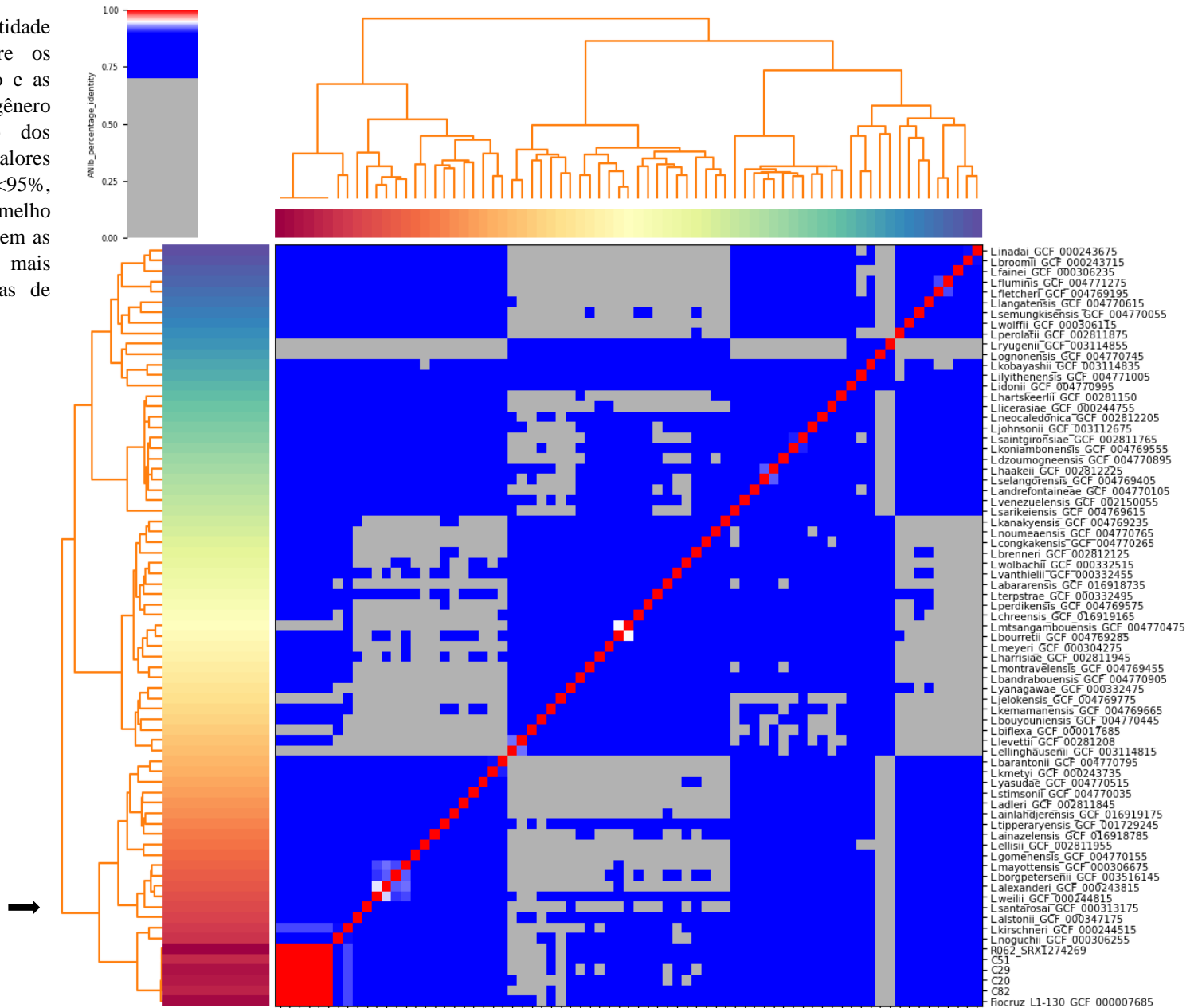
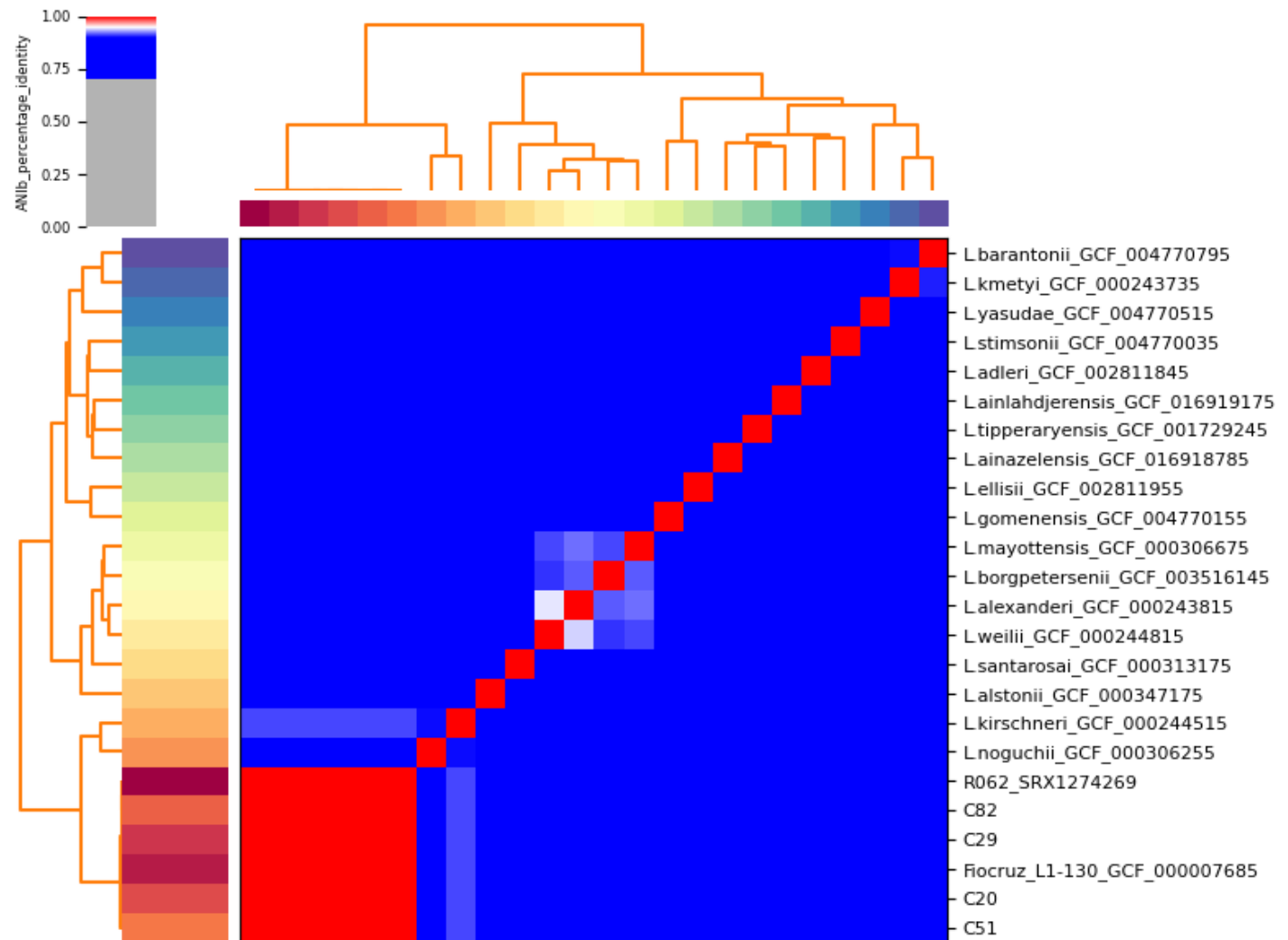


Figura 3 - Representação gráfica da matriz da identidade média de nucleotídeos (ANiB) entre os genomas das cepas do presente estudo e as sequências de espécies que compõem o subclado P1. Observa-se a separação dos clados onde tons cinza representa valores >70%, tons de azul significam valores <95%, branco representam 95% e tons de vermelho >95%. Todas as cepas dos isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, apresentaram acima de 99,88% de similaridade e agruparam junto a sequência do genoma da cepa L1-130



A árvore de máxima verossimilhança (ML) foi construída com base em *core-SNPs* concatenados das sequências das 4 cepas isoladas em amostras de cães e de mais 65 cepas recuperadas a partir de amostras de humanos e diferentes espécies de animais provenientes de diversas localidades. A árvore apresentou uma topologia onde as cepas pertencentes ao sorovar Copenhageni agruparam de forma íntima com suporte estatístico (*bootstrap* 1000 replicatas). A análise filogenética mostrou que essas cepas se agrupam em pequenos clados geográficos, correspondentes às origens potenciais dos isolados (Anexo g - Tabela Suplementar 7, Figura 4).

Figura 4 - Relação filogenética entre cepas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. A árvore filogenética foi construída pelo método ML com 1.000 repetições *bootstrap*, e descreve a relação filogenética entre cepas pertencentes ao sorovares Copenhageni isolados em diferentes localidades geográficas. A análise é baseada em *core-SNPs* concatenados, e o número de diferentes SNPs entre 53 cepas de *L. interrogans*, sorovar Copenhageni. As sequências estão coloridas de acordo com o país de origem do isolamento seguindo a legenda. *L. interrogans* sorovar Lai foi usado como um grupo externo para esta análise



6.4 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS

A comparação do conteúdo gênico utilizando o programa BRIG permitiu observar um nível de sintenia muito alto para as regiões genômicas presentes nas cepas recuperadas de cães e roedor, quando comparadas com a cepa L1-130. Entretanto, algumas regiões do cromossomo 1 (Figura 5), apresentam pequenas áreas com regiões de deleção (setas azuis), observadas principalmente nos isolados caninos. Por outro lado, a comparação do conteúdo genômico do cromossomo 2 dos isolados caninos não apresentou regiões de deleção em relação ao mesmo cromossomo da cepa de referência (Figura 6). Com relação aos dados de comparação entre a cepa do roedor e a L1-130, destaca-se a observação de uma área de divergência de conteúdo observada próxima às posições de 500 e 150 kb nos cromossomos 1 e 2 respectivamente (seta vermelha).

A comparação estrutural gerada pelo ACT está apresentada na Figura 7. Diferente do programa BRIG, ACT faz comparação apenas entre duas sequências. A figura 7 a/d mostra, de cima para baixo, as comparações entre C20-L1-130; L1-130-C29 para os cromossomos 1 (a) e 2 (d). A figura 7 b/e mostra, de cima para baixo, as comparações entre C51-L1-130; L1-130-C82 para os cromossomos 1 (b) e 2 (e). Por fim a figura 7 c/f mostra, as comparações entre L1-130 e da cepa de isolada em roedor R062 para os cromossomos 1 (c) e 2 (f). Foi observada que toda a extensão do genoma dos isolados foi mapeada na sequência, em ambos os cromossomos da cepa de referência, e nenhum elemento extracromossômico foi identificado (por exemplo, fago, plasmídeo). A análise estrutural facilitou a identificação de alguns eventos de variações de arranjo, tais como inversões (blocos de sequências invertidas entre os genomas) e translocações em ambos os cromossomos.

A análise gerada pelo programa Mauve, confirmou o alto grau de sintenia, bem como os rearranjos observados pelo ACT (figura 8 a/b). Observa-se que as sequências das amostras C20 C29 e C51 apresentam áreas divergentes das encontradas no cromossomo 1 (cabeça da seta). Destaca-se que a sequência C29 apresenta pequena variação no tamanho e corrobora os resultados observados na anotação (seta preta). Por fim, pode-se observar na figura 8a, nas sequências C20 e C29, a presença de inversão de blocos de genes (seta vermelha). Não foi observada divergências na comparação do cromossomo 2 (figura 8b)

Figura 5 - Mapa circular dos genomas do **cromossomo 1** de cinco isolados clínicos de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidos em amostras de cães, roedor e humano. A cepa de referência L1-130 é representada pelo anel preto na parte interna da figura. As sequências estão altamente relacionadas e apresentam elevada sintonia. Regiões não relacionadas do genoma são representadas por espaços em branco. Setas vermelhas indicam área divergente exclusiva da cepa isolada de roedores. Setas azuis indicam áreas de diferenças entre a cepa de referência e várias sequências de cães e roedor.

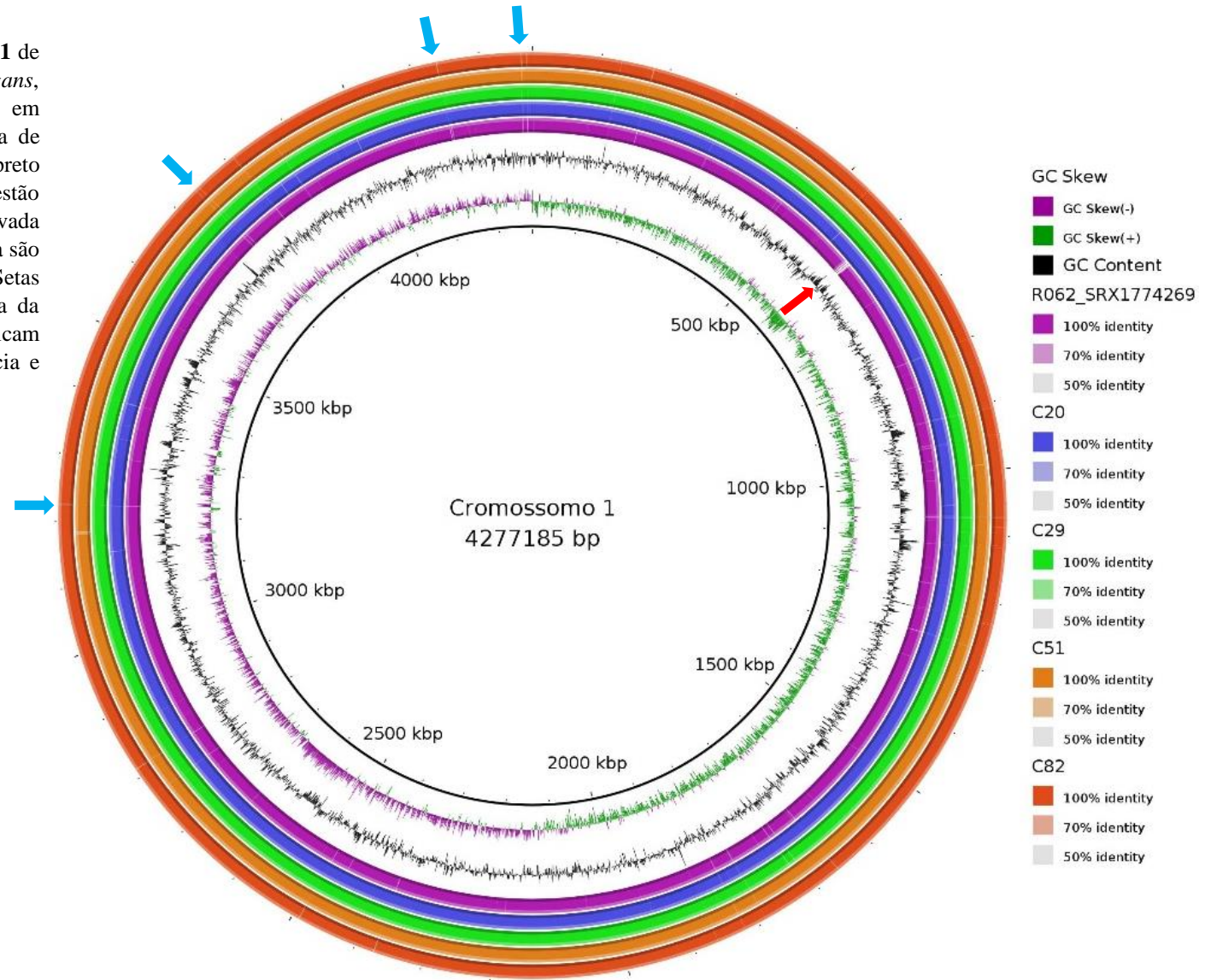


Figura 6 - Mapa circular dos genomas do **cromossomo 2** de cinco isolados clínicos de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidos em amostras de cães, roedor e humano. A cepa de referência L1-130 é representada pelo anel preto na parte interna da figura. As sequências estão altamente relacionadas e apresentam elevada sintonia. Setas vermelhas indicam área divergente exclusiva da cepa isolada de roedores. Demais sequências apresentam elevada sintonia

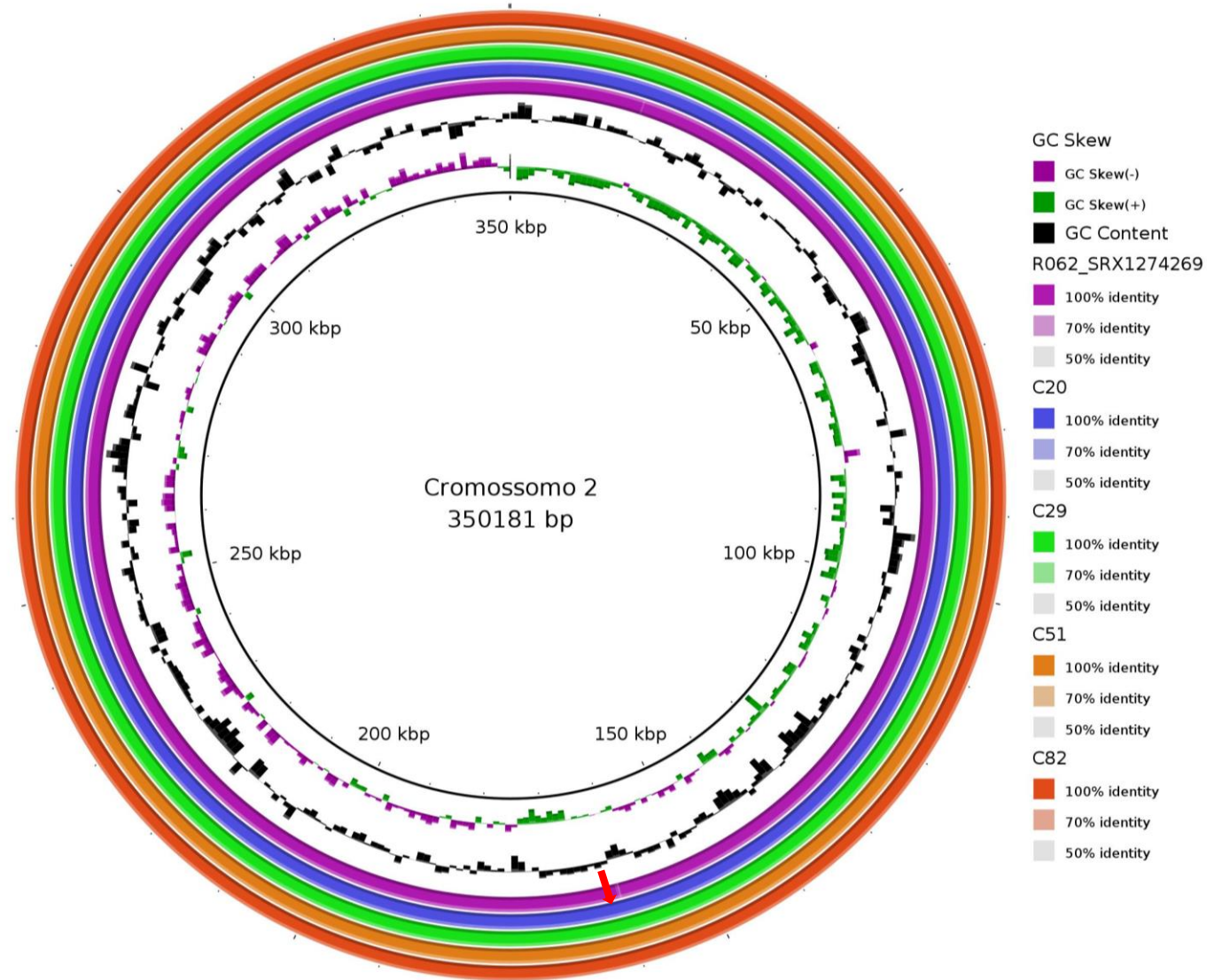


Figura 7 - Avaliação da sintenia entre as seqüências do **cromossomo 1 (a, b, c) e do cromossomo 2 (d, e, f)** das cepas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isoladas em amostras de cães, roedor e humano em um mesmo cenário epidemiológico. (a / d) comparação entre a cepa C20, L1-130 e C29 para os cromossomos 1 e 2 respectivamente, (b / e) comparação entre a cepa C51, L1-130 e C82 para os cromossomos 1 e 2 respectivamente, (c / f) comparação entre a cepa L1-130 e R062 para os cromossomos 1 e 2 respectivamente, (barras correspondem a > 99% identidade). Faixas vermelhas representam regiões semelhantes com mesmo sentido, enquanto as faixas azuis denotam regiões homólogas porém invertidas em relação aquelas presentes no genoma da cepa L1-130

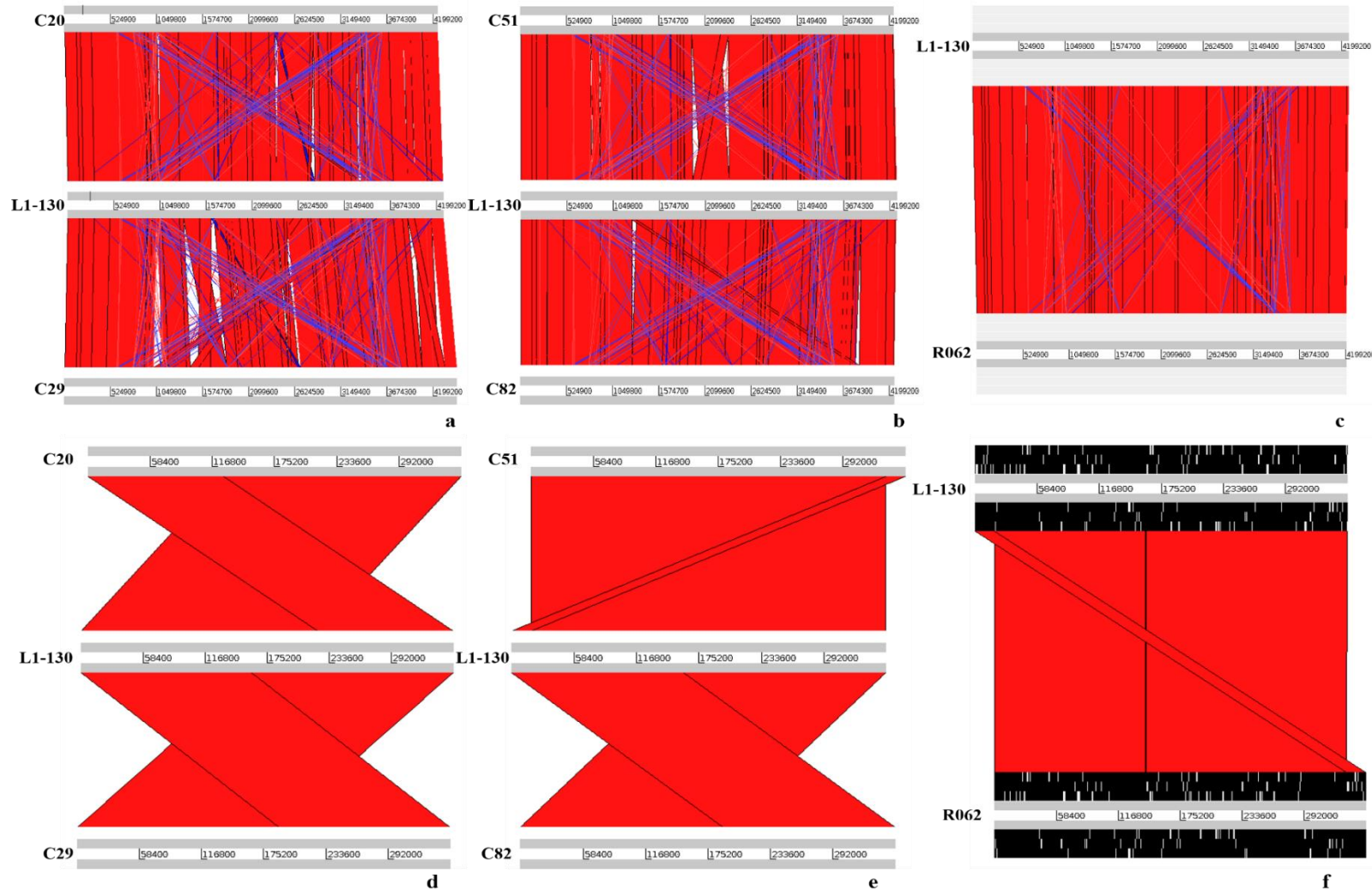
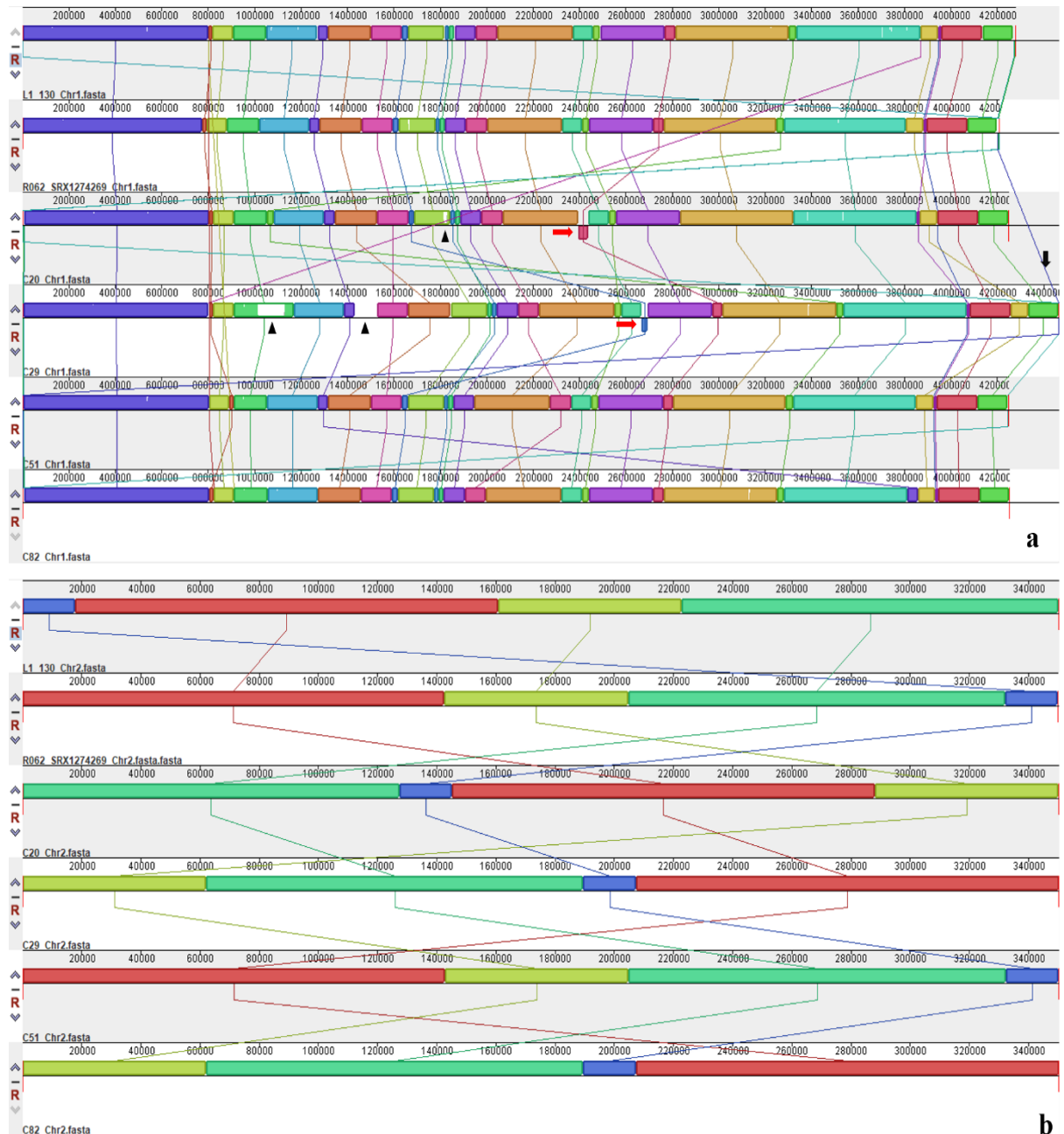


Figura 8 - Análise comparativa entre genomas de isolados de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidas em amostras de cães naturalmente infectado, humano e roedor usando a ferramenta Mauve, (a) cromossomo 1, (b) cromossomo 2. Nessa comparação, as linhas representam as cepas, cada bloco de uma determinada cor representa um trecho sintênico em comparação com as outras, as linhas entre esses blocos indicam os arranjos. As setas vermelhas indicam inversões, os trechos em branco (cabeça de seta) nos blocos indicam regiões únicas. Pode-se observar leve aumento no tamanho da sequência do isolado C29 (seta preta)



7 DISCUSSÃO

Conhecer a circulação e diversidade das espécies de patógenos, bem como sua interação com os potenciais hospedeiros em diferentes cenários epidemiológicos, é fundamental para o controle e profilaxia das enfermidades (AGAMPODI; VINETZ, 2021). A implementação de abordagens multidisciplinares voltadas a investigações clínicas, bacteriológicas e sorológicas são fundamentais para apoiar a tomada de decisão na clínica médica e desenvolver estratégias/protocolos de prevenção (PAZ et al., 2021a). O isolamento bacteriano fornece a possibilidade de obter dados em escala genômica que favorecem estudos de comparação e interação dos agentes patogênicos e hospedeiros. Em adição, possibilita a elucidação de potenciais alvos para drogas e candidatos a imunógenos vacinais (FOUTS et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2004b). Recentemente, a redução no custo do sequenciamento de genomas possibilitou a ampliação das análises e consequente maior disponibilidade de sequenciamentos de procariotos, mesmo em países em desenvolvimento (AGAMPODI; VINETZ, 2021). No entanto, a obtenção de genomas com alta qualidade ainda permanece como uma tarefa desafiadora e é indispensável para a genômica comparativa, funcional e estrutural, bem como para entendimento da evolução e do potencial de virulência do gênero *Leptospira*.

7.1 MELHORIA DA MONTAGEM DO GENOMA

Regiões repetitivas e baixa qualidade do sequenciamento são dois fatores que se destacam como principais empecilhos para a montagem de genomas completos. A utilização de *draft* de genomas permite, na maioria dos casos, a obtenção de dados satisfatórios. Entretanto, a implementação de algumas técnicas é recomendada visando o aumento na qualidade final da montagem (PAGE et al., 2016). O processo de *scaffolding* e o fechamento de *gaps* são exemplos de técnicas de melhoria pós-montagem. O *pipeline* utilizado nesse estudo permitiu que houvesse expressiva melhoria na qualidade final dos genomas, observado em diferentes parâmetros. A redução no número de *contigs* e aumento do N50, bem como a redução de *gaps* destacaram-se. Tal abordagem permitiu melhores resultados nas análises de filogenia, anotação e comparação entre genomas.

7.2 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Com a demonstração das novas espécies, foi observado que o gene 16S, até então usado para filogenia, poderia acrescentar viés no momento da construção da árvore filogenética (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019; KORBA et al., 2021; VINCENT et al., 2019). Recentemente, Vincent e colaboradores (2019) recomendaram a utilização da análise

da identidade média de nucleotídeos como técnica padrão para a classificação de espécie. Nesse mesmo trabalho, os autores também sugerem a possibilidade da utilização do gene *ppk*. Nós testamos as duas técnicas para classificação da espécie. O gene *ppk* possibilitou a reprodução de uma árvore com topologia muito semelhante à obtida por Vincent e colaboradores (2019). As sequências dos isolados de cães, da cepa obtida de roedor e da cepa de referência L1-130 formaram um ramo monofilético, sugerindo que as sequências pertencem à espécie *Leptospira interrogans*. Da mesma forma, a ANI demonstrou que as sequências dos isolados dos cães e roedor se agrupavam junto àquelas do subclado P1, com íntima relação com a espécie *Leptospira interrogans* cepa L1-130. Ao analisarmos a porcentagem de identidade entre as sequências, percebemos que todas elas demonstravam entre 99.88 e 99.97% de identidade, sugerindo assim que não ocorreu especiação por estas cepas e elas permanecem proximamente relacionadas. Análises filogenéticas realizadas por Santos e colaboradores (2018) indicaram que as cepas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e Icterohaemorrhagiae apresentam-se altamente conservadas ao longo do tempo, com tendência a formar agrupamentos geográficos distintos (Brasil, Havaí, Polinésia Francesa, Egito, Dinamarca, Holanda, Japão, Guadalupe, Eslovênia e Colômbia), o que nos permite inferir uma estreita relação na transmissão da enfermidade entre, humanos e roedores. Nossos dados nos permitem sugerir a inserção do cão nessa cadeia de transmissão.

O nível de divergência entre cepas de uma mesma espécie pode ser inferido com base na identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) entre as sequências do genoma bacteriano. Segundo Lata e colaboradores (2020), tal divergência pode sugerir quais forças evolutivas foram expressas nas espécies bacterianas ao longo do tempo. Nós observamos que quando comparado com a cepa L1-130, os isolados proveniente de cães e roedores apresentaram poucos SNPs, reforçando a similaridade entre as sequências isolados nesse mesmo cenário. Apesar do baixo número de polimorfismos, foram observadas mutações sinônimas e mutações *missense*. Dentre as mutações sinônimas, destaca a observada no gene *secY* (importante na identificação utilizando o sequenciamento parcial de genes), que apesar de não mudar a estrutura final da proteína, acreditamos que esse polimorfismo pode acarretar em mal pareamento e conseqüentemente redução na eficiência da reação de PCR. Com relação às mutações *missense*, observamos a presença de SNPs, *indels* (inserção/deleção) e variações complexas (quando mais de uma alteração ocorreu no mesmo gene). Destacamos as mutações observadas na sequência responsável para a síntese de proteína contendo domínio de adenilato/guanilato ciclase. Tais proteínas já foram relacionadas como a formação de biofilme (RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). Realçamos a necessidade de

estudos experimentais voltados a entender o papel dessas mutações na expressão da proteína e, portanto, na formação do biofilme.

As análises filogenéticas de *core-SNPs* baseada em ML indicaram uma elevada relação genética entre as cepas de *L. interrogans* pertencentes ao sorovar Copenhageni. Foi possível observar que mesmo as cepas isoladas em diferentes épocas e proveniente de origens geográficas distintas havia o agrupamento em ramo muito próximo da árvore filogenética, ressaltando que os genomas de leptospiros são altamente conservados (SANTOS et al., 2018). Tal observação destaca mais uma vez que, apesar da distância temporal entre os isolados obtidos a partir da amostra de humano (L1-130 -1996) e cães (C52 - 2018), não foi possível observar mudanças na composição gênica. Apesar da relação filogenética, pode-se observar que as cepas parecem ter evoluído de forma adaptada em diferentes locais agrupando-se próximas de acordo com a regiões geográficas distintas (Colômbia, Guadalupe, Polinésia Francesa, Havaí e Egito, Itaparica). Por outro lado, as cepas isoladas em Salvador, exibiram um padrão de agrupamento misto com isolados de outros países (SANTOS et al., 2018). Não foi observada a formação de agrupamentos das cepas quando relacionada a espécie animal da qual o isolado foi obtido. Tal achado, associado alta similaridade entre os isolados de *Leptospira* proveniente de humanos e animais, fornece evidências genéticas que reafirmam que, em nosso cenário epidemiológico, há manutenção da doença em animais (roedores e cães) e transmissão entre espécies (KURILUNG et al., 2019).

7.3 ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS

As análises comparativas realizadas pelo programa BRIG demonstraram notável similaridade entre as cepas isoladas a partir de cães, roedores e humanos. Pequenas áreas que denotam algumas diferenças entre as sequências dos isolados caninos e a cepa de referência são observadas nas sequências do cromossomo 1. Por outro lado, o cromossomo 2 apresenta raras áreas que indicam diferença entre as sequências dos isolados caninos e a cepa de referência. As pequenas variações podem estar relacionadas a questões do sequenciamento e da montagem, uma vez que as áreas de repetição não podem ser montadas em sequenciamentos com leituras curtas (PAGE et al., 2016).

Duas áreas com discordância foram observadas na sequência dos cromossomos 1 e 2 da cepa recuperada em amostra de roedor; estudos anteriores relacionam essas divergências a áreas contendo genes de *transposons*, proteínas hipotéticas ou elementos de inserções (MORENO et al., 2017, 2018a). Em concordância com o acima exposto, as análises do programa Mauve permitiram a observação de elevada sintonia entre as sequências analisadas.

De forma geral, apesar de algumas translocações e inversões observadas, as sequências mantiveram a similaridade entre o conteúdo gênico, a ordenação e o tamanho dos blocos. Moreno e colaboradores (2016) destacaram que mudanças estruturais podem ser relacionadas às diferentes metodologias de montagem e ordenação aplicadas. Entretanto, faz-se necessária uma avaliação mais criteriosa nas áreas de inserções observadas nos cromossomos 1 de algumas amostras, em especial a amostra C29, onde o tamanho do bloco não foi conservado. Uma das possíveis explicações para o aumento no tamanho dos blocos é a ocorrência de duplicação gênica ou aquisição de novos genes.

7.4 ANOTAÇÃO GENÔMICA

A análise inicial da anotação dos genomas permitiu observar que o conteúdo gênico é semelhante entre os isolados e a cepa de referência. Um ponto que diverge é a presença de sequências codificadoras para flavina redutase, sequências de inserção, e uma lipoproteína com função de adesina. Picardeau (2015) destaca que o número de cópias IS pode variar entre sorovares e até mesmo entre isolados de um determinado sorovar. Em adição, a ausência dessas sequências nos isolados pode estar relacionada às regiões não montadas (*gaps*). Outra diferença que nos chamou a atenção foi o aumento no número de cópias de alguns genes presente no genoma do isolado C29 (incluindo os genes relacionados a formação de parede celular e cápsula), que pode explicar o aumento no tamanho da sequência quando comparado aos outros isolados. A duplicação de genes pode favorecer os organismos, uma vez que proporciona maior tolerância a mutações e adaptação aos hospedeiros (PICARDEAU, 2017b; XU et al., 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre os motivos e mecanismos pelo quais isso ocorre em leptospiros, e mais estudos são necessários para melhor esclarecimento.

A anotação dos genomas dos isolados de cães, humano e roedor, utilizando a metodologia de subsistemas (RAST) confirmam a alta conservação de CDSs entre as cepas de *L. interrogans* com números semelhantes de CDSs e categorias de subsistemas. A maioria dos genes codificam proteínas responsáveis por processos biológicos básicos como transcrição, tradução, síntese da parede celular e motilidade. Estudos realizados com cepas pertencentes a outras espécies e/ou sorovares descrevem números mais elevados de CDSs (KURILUNG et al., 2019; KURILUNG; PERRETEN; PRAPASARAKUL, 2021; LATA et al., 2020). Inferimos que tal variação pode estar relacionada a divergência de genes já descrita entre sorovares distintos (PICARDEAU, 2015).

7.4.1 Fago, sistema CRISPR-Cas e fator de virulência

A utilização de técnicas moleculares para análises genômica de leptospiros permanecem limitadas. Até o momento foram descritos apenas 3 fagos (SCHIETTEKATTE et al., 2018) e 74 plasmídeos (NCBI – acesso 27 de junho de 2022). Por outro lado, Profagos putativos foram detectados em genomas de várias cepas de leptospiros patogênicas e intermediárias, sugerindo assim uma possível participação na evolução dessas espécies (FOUTS et al., 2016). Os profagos descritos nesse estudo foram anteriormente demonstrados em diferentes espécies de *Leptospira* (KURILUNG et al., 2019; KURILUNG; PERRETEN; PRAPASARAKUL, 2021; LATA et al., 2020), inclusive em isolados de *Leptospira interrogans* relacionados a leptospirose severa em humanos (ANUNTAKARUN et al., 2021).

Os sistemas CRISPR-Cas (conjunto de repetições palindrômicas curtas interespaçadas regulatórias associado a genes - cas) compõe o sistema que propicia imunidade adaptativa de bactérias frente à invasão de ácidos nucleicos exógenos estranhos, como bacteriófagos e plasmídeos (MAKAROVA et al., 2015). O conhecimento sobre o real papel do sistema CRISPR-Cas em *Leptospira* é limitado (LATA et al., 2020). Estudos anteriores demonstram que CRISPRs-cas estão presentes apenas em espécies de leptospiros patogênicos e intermediários, enquanto espécies saprofíticas não possuem esse sistema. Tais estudos sugerem que os sistemas CRISPRs-Cas podem desempenhar um papel na patogênese de *Leptospira* (FOUTS et al., 2016; XIAO et al., 2019). Nós observamos que não houve divergência quanto ao tipo de sistemas CRISPR-cas entre os genomas avaliados no presente estudo. Diferentes tipos de sistemas já foram detectados em *L. interrogans* e outras espécies (FOUTS et al., 2016; KURILUNG et al., 2019; KURILUNG; PERRETEN; PRAPASARAKUL, 2021; LATA et al., 2020). Salientamos a necessidade de estudos para elucidar qual a importância dessa divergência entre os sistemas CRISPR-cas dentre as espécies do gênero *Leptospira*.

Leptospira interrogans é a espécie com maior distribuição mundial e é frequentemente encontrada em regiões tropicais (GUGLIELMINI et al., 2019). Os roedores sinantrópicos são amplamente descritos como portadores crônicos e principais carreadores dessa espécie na região estudada; além disso, roedores são considerados a principal fonte de infecção para outros animais e humanos. Salvador é descrita como uma cidade endêmica com elevado número de casos de leptospirose (HAGAN et al., 2016). A taxa anual de infecção pelo agente em humanos é de 37,8 casos por cada 1.000 indivíduos (FELZEMBURGH et al., 2014). Adicionalmente, já foi descrita a circulação ambiental de *Leptospira* patogênicas (CASANOVAS-MASSANA et al., 2021b; SCHNEIDER et al., 2018), bem como em

roedores (COSTA et al., 2014) e outros animais silvestres e domésticos, tais como cães, felinos selvagens e répteis (PAZ et al., 2019, 2021b, 2021a; PAZ; HAMOND; PINNA, 2021, 2022; RODAMILANS et al., 2020). A maioria dos estudos de genômica de leptospiros é voltada a isolados obtidos de animais de produção, humanos e roedores. A elevada circulação de *Leptospira* spp. destaca a importância de constante vigilância em animais para melhor compreender a dinâmica de transmissão entre as espécies e a potencial utilização da população canina como sentinela para a previsão de infecções em humanos (LARSON et al., 2017; SANTOS et al., 2021b).

7.4.2 Genes relacionados a formação de biofilme

A capacidade de formar biofilmes possibilitam as bactérias maior chances de sobrevivência em ambientes naturais e no organismo do hospedeiro. Segundo Liu e colaboradores (2016), a formação de biofilme confere propriedades relevantes às bactérias, sobretudo resistência à antimicrobianos, toxinas, radiação ultravioleta, salinidade, desidratação, oxidação, estresses ambientais, além de maior resistência respostas imunológicas dos hospedeiros. Em um trabalho recente do nosso grupo, Carvalho e colaboradores (Artigo submetido à publicação) demonstraram que isolados autóctones (C20, C29, C51 e C82) obtidos a partir de cães naturalmente infectados são capazes de formar biofilme *in vitro*. Em adição, a expressão desse fenótipo possibilitou uma maior resistência a drogas antimicrobianas testadas.

As bases moleculares relacionadas à formação de biofilme permanecem pouco compreendidas, sobretudo no gênero *Leptospira*. Sabe-se que formação de biofilme é regulada pela molécula de sinalização bis-(3'-5')-monofosfato dimérico de guanosina cíclico (c-di-GMP) em diversas espécies de bactérias, incluindo *L. interrogans* (THIBEAUX et al., 2020). Xiao e colaboradores (2018), descreveram 25 genes relacionados ao metabolismo do c-di-GMP. Observamos que os quatro isolados do presente de trabalho apresentaram 23 dos 25 genes anteriormente descritos como portadores de genes preditos como relacionado ao metabolismo do c-di-GMP. Dentre esses, 20 genes apresentavam mutações na sequência de nucleotídeos e em sete desses as mutações eram responsáveis por variação na sequência de aminoácidos. Apesar da presença de tais mutações, estas não foram significativas em relação a formação de biofilme *in vitro* (CARVALHO e colaboradores – Artigo submetido à publicação). Tendo em vista as mutações encontradas e a permanência na capacidade da formação de biofilme *in vitro* destacamos a necessidade de estudos relacionados a observação da expressão dos genes responsáveis ou ligados à formação de biofilme.

8 CONCLUSÕES

O genoma de cepas de *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, isoladas a partir de amostras clínicas obtidas de cães, roedor e humano são altamente conservados ao longo do tempo e não apresentam agrupamento relacionado a sua distribuição geográfica, demonstrando uma estreita relação evolutiva. A alta similaridade com o genoma de referência isolado de amostra de humano demonstra que cepas autóctones de animais podem apresentar risco para saúde pública.

Há elevada similaridade no conteúdo gênico de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae entre isolados recuperados da infecção em animais e humanos, num mesmo cenário epidemiológico. Todas as cepas apresentam genes que estão relacionados a virulência e adaptabilidade, incluindo genes potencialmente relacionados a formação de biofilme. Avaliações mais criteriosas a respeito dos genes relacionados à virulência, adaptabilidade das cepas, sobretudo os classificados como hipotéticos e genes restritos a cepa, podem auxiliar nas respostas de questões relacionada a fisiopatogenia e clínica da enfermidade em cada hospedeiro.

9 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. et al. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 73–81, nov. 2011.
- ADLER, B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: ADLER, B. (Ed.). ***Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology***. 1º ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. v. 387p. 1–9.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–96, 27 jan. 2010.
- AGAMPODI, S. B.; VINETZ, J. M. Next-generation sequencing analysis of pathogenic *Leptospira*: A way forward for understanding infectious disease dynamics in low/middle-income, disease-endemic settings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 5, p. 1625–1627, 2021.
- AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, p. 28, 2006.
- ALEXANDER, A. D. The distribution of leptospirosis in Latin America. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 23, n. 1955, p. 113–125, 1960.
- ALIKHAN, N. F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.
- ALMEIDA, D. S. et al. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217391, 23 maio 2019.
- ALSTON, J. M.; BROOM, J. C. **Leptospirosis in man and animals**. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone, 1958.
- ANUNTAKARUN, S. et al. Comparative genome characterization of *Leptospira interrogans* from mild and severe leptospirosis patients. **Genomics and Informatics**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 2021.
- ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W16–W21, 2016.
- AWOSANYA, E. J. et al. Factors associated with probable cluster of leptospirosis among

- kennel workers in Abuja, Nigeria. **Pan African medical journal**, v. 16, p. 144–150, 2013.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–15, 2008.
- BALBONI, A. et al. Identification of Serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae in Two Dogs with a Severe Form of Acute Leptospirosis in Italy. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 351, 6 maio 2020.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BERTELLI, C. et al. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W30–W35, 2017.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–71, dez. 2003.
- BOONSILP, S. et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.
- BOSI, E. et al. MeDuSa: A multi-draft based scaffold. **Bioinformatics**, v. 31, n. 15, p. 2443–2451, 2015.
- CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: ADLER, B. (Ed.). **Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1^o ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 21–41.
- CARVALHO, R. R. M. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of biofilm and planktonic form of *Leptospira interrogans* from naturally infected dogs. **Artigo submetido à publicação**.
- CARVER, T. J. et al. ACT: The Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422–3423, 2005.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, p. 1–7, 11 jun. 2019.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira dzianensis* and *Leptospira putramalaysiae* are later heterotypic synonyms of *Leptospira yasudae* and *Leptospira stimsonii*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 71, n. 3, p. 1–2, 2021a.

CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Effect of Sewerage on the Contamination of Soil with Pathogenic *Leptospira* in Urban Slums. **Environmental Science and Technology**, v. 55, n. 23, p. 15882–15890, 2021b.

CHOU, L. F. et al. Potential impact on kidney infection: A whole-genome analysis of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 11, p. e82, 2014.

CILIA, G. et al. Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of *Leptospira* Isolations from “Unconventional” Hosts. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 191, 14 jan. 2021.

CINGOLANI, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. **Fly**, v. 6, n. 2, p. 80–92, 27 abr. 2012.

COSTA, F. et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 17 set. 2015.

COUVIN, D. et al. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W246–W251, 2018.

CROUCHER, N. J. et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 3, p. e15, 2015.

DARLING, A. E.; MAU, B.; PERNA, N. T. Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

DE SÁ, P. H. C. G. et al. GapBlaster - A graphical gap filler for prokaryote genomes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–10, 2016.

DI AZEVEDO, M. I. N. et al. The same strain leading to different clinical outcomes: The enigma behind the canine leptospirosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 165, n. February, p. 105500, 2022.

- DIRECTOR, A. et al. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt_9, p. 1234–1236, 1 set. 2014.
- ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. In: ADLER, B. (Ed.). **Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1^o ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. v. 387p. 99–137.
- ENRIETTI, M. A. Contribuição ao Conhecimento da Incidência de Leptospiras em Murídeos, Caninos e Suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. jubilee, n. 0, p. 311–342, dez. 2001.
- FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. 2^o ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.
- FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* *Noguchi* 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) *Noguchi* 1918. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 4, p. 461–463, 1982.
- FARIA, M. T. DE et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008.
- FEIGIN, R. D. et al. Human Leptospirosis from Immunized Dogs. **Annals of Internal Medicine**, v. 79, n. 6, p. 777, 1 dez. 1973.
- FELZEMBURGH, R. D. M. et al. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2 ago. 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.
- FOUTS, D. E. et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 18 fev. 2016.

- GOARANT, C.; DELLAGI, K.; PICARDEAU, M. Ending the neglect of treatable bacterial zoonoses responsible for non-Malaria fevers. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 2, p. 351–360, 2021.
- GRILLOVÁ, L.; PICARDEAU, M. Core Genome Multi-locus Sequence Typing Analyses of *Leptospira* spp. Using the Bacterial Isolate Genome Sequence Database. In: KOIZUMI, N.; PICARDEAU, M. (Eds.). **Leptospira spp.. Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Human, 2020. p. 11–21.
- GUGLIELMINI, J. et al. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007374, 2019.
- GUREVICH, A. et al. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.
- HAGAN, J. E. et al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004275, jan. 2016.
- HAMOND, C. et al. First isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serogroup Australis from swine in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 6–8, jan. 2015a.
- HAMOND, C. et al. Molecular Characterization and Serology of *Leptospira kirschneri* (Serogroup Grippotyphosa) Isolated from Urine of a Mare Post-Abortion in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 3, p. 191–195, 10 maio 2015b.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263–273, 2009.
- 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. 9620, 2020.
- HOVIND-HOUGEN, K. Leptospiraceae, a new family to include *Leptospira Noguchi* 1917 and *Leptonema* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, n. 3, p. 245–251, 1979.
- HUERTA-CEPAS, J. et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 8, p. 2115–2122, 2017.

- IDO, Y. et al. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **Journal of Experimental Medicine**, v. 26, n. 3, p. 341–353, 1 set. 1917.
- INADA, R. et al. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). **Journal of Experimental Medicine**, v. 23, n. 3, p. 377–402, 1 mar. 1916.
- JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 271–284, 2017.
- JOBINS, S. E.; ALEXANDER, K. A. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: Beyond the usual suspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 5, p. 349–351, 2015.
- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 4 set. 1999.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, out. 2009.
- 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, 2021.
- KUMAR, V. K. et al. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Leptospira* Biofilm. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2015.0284, 25 fev. 2016a.
- KUMAR, V. K. et al. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 311–315, abr. 2016b.
- KURILUNG, A. et al. Correction to: Genomic analysis of *Leptospira interrogans* serovar Paidjan and Dadas isolates from carrier dogs and comparative genomic analysis to detect genes under positive selection. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 246, 28 dez. 2019.
- KURILUNG, A.; PERRETEN, V.; PRAPASARAKUL, N. Comparative Genomic Analysis and a Novel Set of Missense Mutation of the *Leptospira weilii* Serogroup Mini From the Urine of Asymptomatic Dogs in Thailand. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. October, p.

1–17, 2021.

LANDER, E. S.; WATERMAN, M. S. Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis. **Genomics**, v. 2, n. 3, p. 231–239, abr. 1988.

LANTZ, H. et al. Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. **F1000Research**, v. 7, 2018.

LARSON, C. R. et al. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni from a dog from Saint Kitts. **JMM Case Reports**, v. 4, n. 10, p. 1–5, 16 out. 2017.

LATA, K. S. et al. Whole genome sequencing and de novo assembly of three virulent Indian isolates of *Leptospira*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, n. May, p. 104579, 2020.

LAVINSKY, M. O. et al. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 106, n. 1, p. 79–84, 1 set. 2012.

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

LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: ADLER, B. (Ed.). **Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1^o ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 11–20.

LEVETT, P. N.; PICARDEAU, M. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Leptospiraceae* Minutes of the closed meeting, 10 July 2019, Vancouver, British Columbia, Canada. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 3–5, 23 ago. 2021.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.

LIU, W. et al. Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1–8, 2016.

LOAN, H. K. et al. How Important Are Rats As Vectors of Leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 1, p. 56–64, jan. 2015.

LOFFLER, S. G. et al. Genotypes of *Leptospira* spp. strains isolated from dogs in Buenos Aires, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 3, p. 201–204, jul. 2014.

LUO, R. et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 18, 27 dez. 2012.

- MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722–736, 2015.
- MASUZAWA, T. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Leptospira johnsonii* sp. nov., *Leptospira ellinghausenii* sp. nov. and *Leptospira ryugenii* sp. nov. isolated from soil and water in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 63, n. 3–4, p. 89–99, 29 mar. 2019.
- MERIEN, F. et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, 1992.
- MILAS, Z. et al. The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 83, n. 4, p. 357–369, 2013.
- MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, n. 6, p. 315–327, jun. 2010.
- MIOTTO, B. A. et al. Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. **Acta Tropica**, v. 162, p. 1–4, out. 2016.
- MIOTTO, B. A. et al. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2018a.
- MIOTTO, B. A. et al. 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, p. 1–23, 2018b.
- MIRAGLIA, F. et al. Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 1, p. 117–121, 20 dez. 2012.
- MIRAGLIA, F. et al. 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.
- MORENO, L. Z. et al. Comparative genomic analysis of Brazilian *Leptospira kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 539–541, ago. 2016.
- MORENO, L. Z. et al. Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira*

- interrogans* serogroup Australis isolated from swine. **Pathogens and disease**, v. 75, n. 9, p. 1–4, 2017.
- MORENO, L. Z. et al. Comparative genomics of pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from swine and human in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 126–129, 2018a.
- MORENO, L. Z. et al. Genomic characterisation of *Leptospira inadai* serogroup Lyme isolated from captured rat in Brazil and comparative analysis with human reference strain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. 3–6, 2018b.
- MORIKAWA, V. M. et al. Seroprevalence and seroincidence of *Leptospira* infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 50–55, fev. 2015.
- MS. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, DF: Cadernos de Saúde Pública, 2010. v. 8º edição
- MURRAY, G. L. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In: ADLER, B. (Ed.). ***Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology***. 1º ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 139–185.
- NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 459–477, abr. 2004a.
- NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164–2172, 1 abr. 2004b.
- NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira (spirochaeta) icterohaemorrhagiae* (inada and ido). **Journal of Experimental Medicine**, v. 27, n. 5, p. 575–592, 1918.
- OIE. Leptospirosis. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal**. OIE ed. Paris, França.: OIE, 2021. p. 1–13.
- PAGE, A. J. et al. Robust high-throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 8, p. 1–7, 25 ago. 2016.
- PAILHORIÈS, H. et al. Molecular characterization of *Leptospira* sp by multilocus variable

- number tandem repeat analysis (MLVA) from clinical samples: a case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 119–121, 2015.
- PAZ, L. N. et al. Detection of *Leptospira* spp. in Captive Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*). **EcoHealth**, v. 16, n. 4, p. 694–700, 7 dez. 2019.
- 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**, v. 77, n. April, p. 101664, 2021a.
- PAZ, L. N. et al. Unusual case of polyarthrititis and hepatorenal syndrome associated with *Leptospira interrogans* infection in a dog: A case report. **Research in Veterinary Science**, v. 134, n. August 2020, p. 186–190, 2021b.
- PAZ, L. N.; HAMOND, C.; PINNA, M. H. Detection of *Leptospira interrogans* DNA in Urine of a Captive Ocelot (*Leopardus pardalis*). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 793, 19 jan. 2021.
- PAZ, L. N.; HAMOND, C.; PINNA, M. H. Detection of *Leptospira interrogans* in Wild Sambar Deer (*Rusa unicolor*), Brazil. **EcoHealth**, v. 19, n. 1, p. 15–21, 19 mar. 2022.
- PICARDEAU, M. et al. 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. 1–9, 2008.
- PICARDEAU, M. Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. In: ADLER, B. (Ed.). **Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1^o ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 43–63.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017a.
- PICARDEAU, M. *Leptospira*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017b. p. 1–18.
- PIRO, V. C. et al. FGAP: An automated gap closing tool. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2014.
- PRITCHARD, L. et al. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 12–24, 2016.

PUCHE, R. et al. *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.

QUERINO, A. M. V. et al. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 27–34, 10 maio 2003.

RAGHAVAN, R. K. et al. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 107, n. 1–2, p. 105–109, 2012.

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

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. (Pt 5), p. 1309–17, maio 2008.

RODAMILANS, G. M. et al. *Leptospira interrogans* in wild Boa constrictor snakes from Northeast Brazil peri-urban rainforest fragments. **Acta Tropica**, v. 209, n. June, p. 105572, set. 2020.

ROJAS, P. et al. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 10, p. 1305–1309, 18 out. 2010.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1–52, 2013.

ROSSETTI, C. A. et al. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 241–248, maio 2005.

SANTOS, A. A. N. et al. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1161–1164, dez. 2015.

SANTOS, A. A. N. et al. *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 8 set. 2021a.

SANTOS, C. M. et al. Molecular and serological characterization of pathogenic *Leptospira*

spp. isolated from symptomatic dogs in a highly endemic area, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2021b.

SANTOS, L. A. et al. Genomic Comparison Among Global Isolates of *L. interrogans* Serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae Identified Natural Genetic Variation Caused by an Indel. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. June, p. 1–11, 19 jun. 2018.

SCHIETTEKATTE, O. et al. Characterization of LE3 and LE4, the only lytic phages known to infect the spirochete *Leptospira*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

SCHNEIDER, A. G. et al. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2018.

SIMS, D. et al. Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 2, p. 121–132, 2014.

SINGH, R. et al. Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 6, p. 3412–3420, 2003.

SOUVOROV, A.; AGARWALA, R.; LIPMAN, D. J. SKESA: Strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. **Genome Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2018.

SPANGLER, D. et al. Leptospiral shedding and seropositivity in shelter dogs in the Cumberland Gap Region of Southeastern Appalachia. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2020.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

STIMSON, A. M. Note on an Organism Found in Yellow-Fever Tissue. **Public Health Reports (1896-1970)**, v. 22, n. 18, p. 541, 1907.

SUEPAUL, S. M. et al. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 7, p. 1059–1070, 8 jul. 2010.

SYKES, J. E. et al. 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.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

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.
- TATUSOVA, T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 2016.
- THIBEAUX, R. et al. 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.
- THOMÉ, S. et al. Identification of immunodominant antigens in canine leptospirosis by Multi-Antigen Print ImmunoAssay (MAPIA). **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 288, 3 dez. 2014.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: [s.n.].
- VAN THIEL, P. H. **The leptospiroses**. Leiden: Univeritaire Pers Leiden, 1948.
- VARNI, V. et al. Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 216–222, 2014.
- VINCENT, A. T. et al. 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.
- VORONINA, O. L. et al. The Characteristics of Ubiquitous and Unique *Leptospira* Strains from the Collection of Russian Centre for Leptospirosis. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. In: [s.l.] World Health Organization, 2003.
- WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. 1–22, 2017.
- WUNDER, E. A.; ESHGHI, A.; BENAROUDJ, N. Pathogenesis of *Leptospira*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. September, p. 1–2, 2018.
- XIAO, G. et al. Identification and characterization of c-di-GMP metabolic enzymes of *Leptospira interrogans* and c-di-GMP fluctuations after thermal shift and infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, 2018.
- XIAO, G. et al. Characterization of CRISPR-Cas systems in *Leptospira* reveals potential

application of CRISPR in genotyping of *Leptospira interrogans*. **Apmis**, v. 127, n. 4, p. 202–216, 2019.

XU, M. et al. TGS-GapCloser: A fast and accurate gap closer for large genomes with low coverage of error-prone long reads. **GigaScience**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2020.

XU, Y. et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20020, 2 abr. 2016.

YASUDA, P. H. et al. 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.

ZACARIAS, F. G. D. S. et al. Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 744–748, dez. 2008.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ZHANG, R. et al. Comparative genomic analysis of Chinese human leptospirosis vaccine strain and circulating isolate. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2020.

ANEXOS

Anexo a - Tabela Suplementar 1 – Comparação da performance dos cinco programas destinados à montagem de genoma bacterianos sequenciados na plataforma MiSeq Illumina

Continua

Estatística do genoma	C20_velvet	C20_S.denovo	C20_skesa	C20_unicycler	C20_spades
Cobertura (%) ¹	96.227	98.421	98.571	98.583	99.132
Comprimento do alinhamento ²	4464314	4566198	4561106	4562325	4589593
Mapeamento de leituras					
Número de leituras mapeadas	1669430	1694495	1679003	1679573	1679886
Leituras mapeadas (%)	98.75	99.24	99.56	99.53	99.8
Profundidade de cobertura	82	81	82	82	81
Estatística da montagem					
Número de <i>contigs</i> ³	421	553	165	87	79
Tamanho do maior <i>contig</i>	68551	39246	156747	350072	350198
Comprimento total das leituras	4466277	4568242	4563206	4564358	4591570
N50 ⁴	18515	13964	44862	85339	105577
L50 ⁵	76	107	32	15	12
NG50 ⁶	17710	13934	43164	82163	105577
LG50 ⁷	81	109	33	16	12
GC (%) ⁸	35.13	34.99	35.02	35	35.01
	C29_velvet	C29_S.denovo	C29_skesa	C29_unicycler	C29_spades
Estatística do genoma					
Cobertura (%) ¹	96.921	99.099	98.779	98.78	99.198
Comprimento do alinhamento ²	4491363	4594371	4571253	4571670	4593305
Mapeamento de leituras					
Número de leituras mapeadas	2339038	2348198	2338482	2336595	2336766
Leituras mapeadas (%)	99.49	99.76	99.66	99.57	99.87
Profundidade de cobertura	117	115	116	115	116
Estatística da montagem					
Número de <i>contigs</i> ³	57	247	91	67	66
Tamanho do maior <i>contig</i>	3987883	119353	350181	366367	350268
Comprimento total das leituras	4500391	4596338	4573283	4573800	4595269
N50 ⁴	3987883	33648	91079	133079	184145
L50 ⁵	1	40	13	10	9
NG50 ⁶	3987883	33360	91079	133079	133434
LG50 ⁷	1	41	13	10	10
GC (%) ⁸	35.19	34.99	34.99	34.99	35
	C51_velvet	C51_S.denovo	C51_skesa	C51_unicycler	C51_spades
Estatística do genoma					
Cobertura (%) ¹	95.979	98.936	98.625	98.626	99.087
Comprimento do alinhamento ²	4458119	4591483	4563914	4565735	4587698
Mapeamento de leituras					
Número de leituras mapeadas	3261193	3287252	3269802	3263409	3269025
Leituras mapeadas (%)	99.3	99.66	99.63	99.38	99.83
Profundidade de cobertura	155	152	153	153	153

Anexo a - Tabela Suplementar 1 - Comparação da performance dos cinco programas destinados à montagem de genoma bacterianos sequenciados na plataforma MiSeq Illumina

Conclusão

	C51_velvet	C51_S.denovo	C51_skesa	C51_unicycler	C51_spades
Estatística da montagem					
Número de <i>contigs</i> ³	39	349	103	70	69
Tamanho do maior <i>contig</i>	2740184	101788	350181	350096	350244
Comprimento total das leituras	4473629	4593451	4565941	4567772	4592982
N50 ⁴	2740184	23085	87007	123215	159646
L50 ⁵	1	63	16	12	9
NG50 ⁶	2740184	23085	87007	123215	159646
LG50 ⁷	1	63	16	12	9
GC (%) ⁸	35.27	34.98	34.99	34.98	35.02
	C82_velvet	C82_S.denovo	C82_skesa	C82_unicycler	C82_spades
Estatística do genoma					
Cobertura (%) ¹	98.407	99.048	98.799	98.815	99.229
Comprimento do alinhamento ²	4565568	4590847	4572019	4573329	4595108
Mapeamento de leituras					
Número de leituras mapeadas	4464029	31096			
Leituras mapeadas (%)	3029048	3042350	3023577	3027685	3020653
Profundidade de cobertura	99.76	99.7	99.65	99.74	99.86
	146	145	146	146	145
Estatística da montagem					
Número de <i>contigs</i> ³	43	281	78	60	67
Tamanho do maior <i>contig</i>	4464029	113417	350181	350084	417526
Comprimento total das leituras	4576060	4593442	4574053	4575366	4599081
N50 ⁴	4464029	31096	109493	133278	136571
L50 ⁵	1	47	11	10	10
NG50 ⁶	4464029	31096	109493	133278	136571
LG50 ⁷	1	47	11	10	10
GC (%) ⁸	35.09	34.99	34.99	34.99	35.01

¹ Cobertura baseada no genoma de referência *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa L1-130 (número de acesso: NC005823 e NC005824) (NASCIMENTO et al., 2004a);

²Comprimento da sequência de referência 4.627.366 bp; ³Toda estatística é baseada no tamanho mínimo de 500 bp para os *contigs* (padrão); ⁴N50 é o comprimento da sequência do menor *contig* que cobre 50% do comprimento total do genoma (montado); ⁵L50 é a contagem do menor número de *contigs* cuja soma de comprimento representa a metade do tamanho do genoma (montado); ⁶NG50 é o tamanho do menor *contig* que compõe 50% do comprimento (estimado) do genoma de referência; ⁷LG50 é a contagem do menor número de *contigs* que constituem 50% do comprimento (estimado) do genoma de referência; ⁸GC (%) da referência = 35,04.

Anexo b - Tabela Suplementar 2 - Informações gerais de todas as sequências de *Leptospira* spp. usadas neste estudo (incluindo números de acesso)

Continua

Espécie	Número de acesso (RefSeq)	Número de acesso (Biosample)	Referência
<i>L. adleri</i>	GCF_002811845	SAMN07411421	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. alexanderi</i>	GCF_000243815	SAMN02436435	-
<i>L. alstonii</i>	GCF_000347175	SAMN01801604	-
<i>L. andrefontaineae</i>	GCF_004770105	SAMN10316440	VINCENT et al (2019)
<i>L. bandrabouensis</i>	GCF_004770905	SAMN10316367	VINCENT et al (2019)
<i>L. barantonii</i>	GCF_004770795	SAMN10316399	VINCENT et al (2019)
<i>L. biflexa</i>	GCF_000017685	SAMN02603347	PICARDEAU et al., (2008)
<i>L. borgpetersenii</i>	GCF_003516145	SAMN08498447	VINCENT et al (2019)
<i>L. bourretii</i>	GCF_004769285	SAMN10316426	VINCENT et al (2019)
<i>L. bouyouniensis</i>	GCF_004770445	SAMN10316375	VINCENT et al (2019)
<i>L. brenneri</i>	GCF_002812125	SAMN07411426	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. broomii</i>	GCF_000243715	SAMN02436587	LEVETT et al., (2006)
<i>L. congkakensis</i>	GCF_004770265	SAMN10316396	VINCENT et al (2019)
<i>L. dzoumogneensis</i>	GCF_004770895	SAMN10316368	VINCENT et al (2019)
<i>L. ellinghausenii</i>	GCF_003114815	SAMD00111975	MASUZAWA et al., (2019)
<i>L. ellisii</i>	GCF_002811955	SAMN07411411	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. fainei</i>	GCF_000306235	SAMN02436574	PEROLAT et al., (1998)
<i>L. fletcheri</i>	GCF_004769195	SAMN10316445	VINCENT et al (2019)
<i>L. fluminis</i>	GCF_004771275	SAMN10316443	VINCENT et al (2019)
<i>L. gomenensis</i>	GCF_004770155	SAMN10316438	VINCENT et al (2019)
<i>L. haakeii</i>	GCF_002812225	SAMN07411408	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. harrisiae</i>	GCF_002811945	SAMN07411419	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. hartskeerlii</i>	GCF_002811505	SAMN07411429	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. idonii</i>	GCF_004770995	SAMN10316364	VINCENT et al (2019)
<i>L. ilyithenensis</i>	CF_004771005	SAMN10316365	VINCENT et al (2019)
<i>L. inadai</i>	GCF_000243675	SAMN02436595	SCHMID et al., (1986)
<i>L. interrogans</i>	GCF_000092565	SAMN02603127	REN et al., (2003)
<i>L. interrogans</i> - L1-130	GCF_000007685	SAMN02603847	NASCIMENTO et al., (2004b)
<i>L. jelokensis</i>	GCF_004769775	SAMN10316395	VINCENT et al (2019)
<i>L. johnsonii</i>	GCF_003112675	SAMD00111974	MASUZAWA et al., (2019)
<i>L. kanakyensis</i>	GCF_004769235	SAMN10316432	VINCENT et al (2019)
<i>L. kemamanensis</i>	GCF_004769665	SAMN10316406	VINCENT et al (2019)
<i>L. kirschneri</i>	GCF_000244515	SAMN02436380	-
<i>L. kmetyi</i>	GCF_000243735	SAMN02436507	-
<i>L. kobayashii</i>	GCF_003114835	SAMD00111976	MASUZAWA et al., (2019)
<i>L. koniambonensis</i>	GCF_004769555	SAMN10316414	VINCENT et al (2019)
<i>L. langatensis</i>	GCF_004770615	SAMN10316447	VINCENT et al (2019)
<i>L. levettii</i>	GCF_002812085	SAMN07411430	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. licerasiae</i>	GCF_000244755	SAMN02436421	RICALDI et al., (2012)
<i>L. mayottensis</i>	GCF_000306675	SAMN10316370	VINCENT et al (2019)
<i>L. meyeri</i>	GCF_000304275	SAMN02436259	-
<i>L. montravelensis</i>	GCF_004769455	SAMN10316425	VINCENT et al (2019)
<i>L. mtsangambouensis</i>	GCF_004770475	SAMN10316376	VINCENT et al (2019)

Anexo b - Tabela Suplementar 2 - Informações gerais de todas as sequências de *Leptospira* spp. usadas neste estudo (incluindo números de acesso)

			Conclusão
Espécie	Número de acesso (RefSeq)	Número de acesso (Biosample)	Referência
<i>L. neocaledonica</i>	GCF_002812205	SAMN07411416	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. noguchii</i>	GCF_000306255	SAMN02436411	-
<i>L. noumeaensis</i>	GCF_004770765	SAMN10316428	VINCENT et al (2019)
<i>L. ognonensis</i>	GCF_004770745	SAMN10316409	VINCENT et al (2019)
<i>L. perdikensis</i>	GCF_004769575	SAMN10316412	VINCENT et al (2019)
<i>L. perolatii</i>	GCF_002811875	SAMN07411417	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. ryugenii</i>	GCF_003114855	SAMD00111977	MASUZAWA et al., (2019)
<i>L. saintgironsiae</i>	GCF_002811765	SAMN07411425	THIBEAUX et al., (2018)
<i>L. santarosai</i>	GCF_000313175	SAMN02470123	CHOU et al., (2014)
<i>L. sarikeiensis</i>	GCF_004769615	SAMN10316407	VINCENT et al (2019)
<i>L. selangorensis</i>	GCF_004769405	SAMN10316446	VINCENT et al (2019)
<i>L. semungkisensis</i>	GCF_004770055	SAMN10316449	VINCENT et al (2019)
<i>L. stimsonii</i>	GCF_004770035	SAMN10316448	CASANOVAS-MASSANA et al., (2019)
<i>L. terpstrae</i>	GCF_000332495	SAMN02436484	-
<i>L. tipperaryensis</i>	GCF_001729245	SAMN04546715	NALLY et al., (2016)
<i>L. vanthielii</i>	GCF_000332455	SAMN02436568	-
<i>L. venezuelensis</i>	GCF_002150055	SAMN06855518	PUCHE et al., (2018)
<i>L. weilii</i>	GCF_000244815	SAMN00739295	-
<i>L. wolbachii</i>	GCF_000332515	SAMN02436569	-
<i>L. wolffii</i>	GCF_000306115	SAMN02436578	-
<i>L. yanagawae</i>	GCF_000332475	SAMN02436394	-
<i>L. ainazelensis</i>	GCF_016918785	SAMN17767091	KORBA et al (2021)
<i>L. abararensis</i>	GCF_016918735	SAMN17767093	KORBA et al (2021)
<i>L. chreensis</i>	GCF_016919165	SAMN17767092	KORBA et al (2021)
<i>L. ainlahdjerensis</i>	GCF_016919175.1	SAMN17767090	KORBA et al (2021)
<i>L. yasudae</i>	GCF_004770515	SAMN10316369	CASANOVAS-MASSANA et al., (2019)

Anexo c - Tabela Suplementar 3 - Relação de profago incompleto preditos no genoma das cepas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães, humano e roedor

ID isolado	Tamanho da Região	Estados	Score	Nº total de proteínas	Posição da região	Fago mais comum	GC %
C20	6.1Kb	incompleto	40	7	1070054-1076218	PHAGE_Escher_Murica_NC_041871(1)	39.92%
	7Kb	incompleto	10	7	1525181-1532257	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_047713(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	11	1607124-1618526	PHAGE_Escher_phAPEC8_NC_020079(4)	32.28%
	9.3Kb	incompleto	10	9	2823493-2832887	PHAGE_Prochl_P_SSM2_NC_006883(1)	37.84%
C29	6.1Kb	incompleto	40	7	1102581-1108745	PHAGE_Shewan_SppYZU05_NC_047824(1)	39.92%
	7Kb	incompleto	10	7	1603964-1611040	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_047713(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	10	1685910-1697312	PHAGE_Escher_ESCO5_NC_047776(4)	32.28%
	9.3Kb	incompleto	10	9	2725389-2734783	PHAGE_Bacill_G_NC_023719(1)	37.84%
	7Kb	incompleto	10	7	2940180-2947256	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_047712(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	10	3022126-3033528	PHAGE_Escher_ESCO5_NC_047776(4)	32.28%
C51	6.1Kb	incompleto	40	7	1097740-1103904	PHAGE_Aeriba_AP45_NC_048651(1)	39.92%
	7Kb	incompleto	10	7	1598220-1605296	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_026927(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	11	1680165-1691567	PHAGE_Escher_ESCO13_NC_047770(4)	32.28%
	9.3Kb	incompleto	10	9	2851509-2860903	PHAGE_Bacill_SP_15_NC_031245(1)	37.84%
C82	6.1Kb	incompleto	40	7	1145249-1151413	PHAGE_Serrat_MyoSmar_NC_048800(1)	39.92%
	7Kb	incompleto	10	7	1645856-1652932	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_047714(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	11	1727801-1739203	PHAGE_Escher_ESCO5_NC_047776(4)	32.28%
	9.3Kb	incompleto	10	9	2900073-2909467	PHAGE_Synech_ACG_2014b_NC_027130(1)	37.84%
L1-130	9.3Kb	incompleto	10	9	1386774-1396168	PHAGE_Klebsi_ST16_OXA48phi5.4_NC_049450(1)	37.84%
	11.4Kb	incompleto	10	11	2563748-2575150	PHAGE_Escher_ESCO5_NC_047776(4)	32.29%
	7Kb	incompleto	10	7	2650019-2657095	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_026927(2)	36.75%
	6.1Kb	incompleto	40	7	3152985-3159149	PHAGE_Escher_Murica_NC_041871(1)	39.92%
R062	6.1Kb	incompleto	40	7	1101205-1107369	PHAGE_Escher_rv5_NC_011041(1)	39.94%
	7Kb	incompleto	10	7	1600258-1607334	PHAGE_Synech_ACG_2014f_NC_047712(2)	36.77%
	11.4Kb	incompleto	10	10	1682203-1693605	PHAGE_Escher_phAPEC8_NC_020079(4)	32.28%
	9.3Kb	incompleto	10	9	2850486-2859880	PHAGE_Bacill_G_NC_023719(1)	37.84%

Anexo d - Tabela suplementar 4 - Predição de sistemas CRISPR-cas em genomas de *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães, humano e roedor

Continua

ID isolado	Arranjo CRISPR						Clusteres de Cas			
	Sequencia consenso – CRISPR	Tamanho da repetição	Início	Final	Tamanho do CRISPR	Números de space	Subtipos de cas	Início	Final	Geses cas
C20	GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	274167	274261	94	1	CAS-TypeIC	718130	725568	
	TGTGGGAAGCTCTCACAAGTTAGAAATTTGTCAG	32	871788	871889	101	1				cas2_TypeI-II-III,
	ATTATTTATTAATTAATAAATAAGTAAGTCTCGTTT	34	903417	903527	110	1				cas1_TypeIC,
	CTCTTAGAACGATCAAGATTTTGATATGAAATTAATAA	39	1142274	1142376	102	1				cas4_TypeI-II,
	ATTACGTCTCTTTGTAAGTACACACTTGTT	29	1838813	1838904	91	1				cas7c_TypeIC,
	TGAACTCAATGCATCACTTCCTA	23	2214248	2214338	90	1				cas8c_TypeIC,
	GATCTTGTGTAATTTGTGGGAAGCTC	25	2529445	2529545	100	1				cas5c_TypeIC,
	AAAAGTCAACACAACGCTTTCCT	23	2604442	2604535	93	1				cas3_TypeI,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2768041	2768207	166	2				cas3a_TypeI
TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2768317	2768620	303	4					
C29	GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	352318	352412	94	1	CAS-TypeIC	720574	728012	
	TGTGGGAAGCTCTCACAAGTTAGAAATTTGTCAG	32	871727	871828	101	1				cas2_TypeI-II-III,
	CTCTTAGAACGATCAAGATTTTGATATGAAATTAATAA	39	1174881	1174983	102	1				cas1_TypeIC,
	AACAAGTGTGAGTTTCAAAGAGACGTAAT	29	1463453	1463544	91	1				cas4_TypeI-II,
	TGAACTCAATGCATCACTTCCTA	23	2273311	2273401	90	1				cas7c_TypeIC,
	GATCTTGTGTAATTTGTGGGAAGCTC	25	2589930	2590030	100	1				cas8c_TypeIC,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2669937	2670103	166	1				cas5c_TypeIC,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2670213	2670516	303	2				cas3_TypeI,
	AAAAGTCAACACAACGCTTTCCT	23	2823508	2823601	93	1				cas3a_TypeI
C51	GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	276966	277060	94	1	CAS-TypeIC	720498	727936	
	TGTGGGAAGCTCTCACAAGTTAGAAATTTGTCAG	32	871651	871752	101	1				cas2_TypeI-II-III,
	CTCTTAGAACGATCAAGATTTTGATATGAAATTAATAA	39	1170040	1170142	102	1				cas1_TypeIC,
	AACAAGTGTGAGTTTCAAAGAGACGTAAT	29	1457759	1457850	91	1				cas4_TypeI-II,
	TGAACTCAATGCATCACTTCCTA	23	1916458	1916548	90	1				cas7c_TypeIC,
	GATCTTGTGTAATTTGTGGGAAGCTC	25	2557347	2557447	100	1				cas8c_TypeIC,
	AAAAGTCAACACAACGCTTTCCT	23	2632338	2632431	93	1				cas5c_TypeIC,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2796057	2796223	166	2				cas3_TypeI,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2796333	2796636	303	4				cas3a_TypeI
C82	GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	273939	274033	94	1	CAS-TypeIC	763290	770728	
	TGTGGGAAGCTCTCACAAGTTAGAAATTTGTCAG	32	914443	914544	101	1				cas2_TypeI-II-III,
	CTCTTAGAACGATCAAGATTTTGATATGAAATTAATAA	39	1217549	1217651	102	1				cas1_TypeIC,
	AACAAGTGTGAGTTTCAAAGAGACGTAAT	29	1505359	1505450	91	1				cas4_TypeI-II,
	TGAACTCAATGCATCACTTCCTA	23	2289414	2289504	90	1				cas7c_TypeIC,
	GATCTTGTGTAATTTGTGGGAAGCTC	25	2605701	2605801	100	1				cas8c_TypeIC,
	AAAAGTCAACACAACGCTTTCCT	23	2680905	2680998	93	1				cas5c_TypeIC,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2844621	2844787	166	2				cas3_TypeI,
	TTTTTTAAATTTTCCTATTTCTTTAGGAA	28	2844897	2845200	303	4				cas3a_TypeI

Conclusão

ID isolado	Arranjo CRISPR						Clusteres de Cas			
	Sequencia consenso – CRISPR	Tamanho da repetição	Início	Final	Tamanho do CRISPR	Números de space	Subtipos de cas	Início	Final	Geses cas
L1-130	AACGCTCTTTATGAATCGCGTTG	23	442732	442824	92	1	CAS-TypeIC	3535328	3542766	cas3a_TypeI, cas3_TypeI, cas5c_TypeIC, cas8c_TypeIC, cas7c_TypeIC, cas4_TypeI-II, cas1_TypeIC, cas2_TypeI-II-III
	GTGCTCAACGCCTAACGGCATCAAAGTTATATTCAG	36	1133848	1134101	253	3				
	TTCCTAAAGAAATAGGGAATTTAAAAAAA	28	1451041	1451345	304	4				
	TTCCTAAAGAAATAGGGAATTTAAAAAAA	28	1451455	1451551	96	1				
	AGGAAAGCGTTGTGTTGAGTTTT	23	1615099	1615192	93	1				
	GAGTTCCCACAATTTACACGAGATC	25	1691119	1691219	100	1				
	TAGGAAGTGATGCATTGAGTTCA	23	2011715	2011805	90	1				
	ATTACGTCTCTTTGTAACACACTTGTT	29	2797856	2797947	91	1				
	TTTTTTAATTTTCATATCAAAAATCTTGATCGTTTTAAGAG	39	3086747	3086849	102	1				
	CTGACAAATTCTAAGTTGTAAGAGTTCCCACA	32	3391097	3391198	101	1				
AGGAAAGCGTTGTGTTGAGTTTTCC	25	3991732	3991827	95	1	CAS-TypeIC	720984	728422	cas2_TypeI-II-III, cas1_TypeIC, cas4_TypeI-II, cas7c_TypeIC, cas8c_TypeIC, cas5c_TypeIC, cas3_TypeI, cas3a_TypeI	
GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	281838	281932	94	1					
TGTGGGAACCTCACAACCTTAGAATTTGTCAG	32	871533	871634	101	1					
CTCTTAGAACGATCAAGATTTTGATATGAAATTTAAAAAAA	39	1173459	1173561	102	1					
AACAAGTGTGAGTTTCAAAGAGACGTAAT	29	1460369	1460460	91	1					
GGAAACTCAACACAACGCTTTCCT	24	2068515	2068609	94	1					
TGAACTCAATGCATCACTTCCTA	23	2241171	2241261	90	1					
GATCTTGTGTAAATTGTGGGAACCTC	25	2558792	2558892	100	1					
TTTTTTAAATTTCTATTTCTTTAGGAA	28	2795034	2795200	166	2					
TTTTTTAAATTTCTATTTCTTTAGGAA	28	2795310	2795613	303	4					
AGTTCCCACAGTTTCAAAGTTAGTCTGTAAACTC	35	2928965	2929115	150	1					

Anexo e - Tabela Suplementar 5 - Comparação de polimorfismos encontrados em sequências de nucleotídeos/proteínas com domínios de c-di-GMP presentes em cepas *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, obtidos a partir de amostras de cães, roedor e humano com *L. interrogans* sorovar Lai

GGDEF	ID gene	Mutações (Gene)	Mutações (Nº da base - Troca)	Mutações (Proteínas)	Mutações (Nº do Aminoácido - Troca)
1.	LA2528 (LA_RS10520)	1	999 - A/G	0	0
2.	LA2926 (LA_RS12060)	0	0	0	0
3.	LA2927 (LA_RS12065)	2	327 - C/A 819 - T/C	1	60 - N/D
4.	LA2929 (LA_RS12070)	2	355 - A/G 951 - C/T	1	119 - K/E
5.	LA2930 (LA_RS12075)	3	321 - A/G 342 - C/T 645 - C/T	0	0
6.	LA2931 (LA_RS12080)	3	220 - G/A 255 - T/C 476 - G/A	2	74 - V/I 159 R/H
7.	LA2932 (LA_RS12085)	0	-	0	0
8.	LA2933 (LA_RS12090)	3	159 - C/T 711 - G/A 741 - C/T	0	0
9.	LA1483 (LA_RS06115)	2	194 - C/T	1	65 - A/V
10.	LA3929 (LA_RS15950)	2	048 - C/T 465 - A/G	0	0
11.	LA2704 (LA_RS11225)	1	363 - C/T	0	0
13.	LB240 (LA_RS18700)	3	308 - A/G 642 - G/A 1245 - A/G	1	103 - K/R
GGDEF+EAL	ID gene	Mutações (Gene)	Mutações (Nº da base - Troca)	Mutações (Proteínas)	Mutações (Nº do Aminoácido - Troca)
1.	LA1185 (LA_RS04930)	2	894 - C/T 1281 - C/T	0	0
2.	LB235 (LA_RS18690)	4	486 - C/T 651 - C/T 978 - G/A 1005 - T/C	0	0
EAL	ID gene	Mutações (Gene)	Mutações (Nº da base - Troca)	Mutações (Proteínas)	Mutações (Nº do Aminoácido - Troca)
1.	LA2827 (LA_RS11700)	3	1080 - C/A 1092 - T/C 1104 - G/A	0	0
2.	LA3104 (LA_RS12725)	0	0	0	0
3.	LB133 (LA_RS18290)	7	069 - G/A 222 - C/T 312 - C/A 893 - T/C 1113 - C/T 1180 - C/T 1596 - C/T	1	298 - L/P
4.	LB261 (LA_RS18775)	2	412 - C/T 1320 - T/C	0	0
5.	LA1983 (LA_RS08195)	1	1275 - A/G	0	0
HD-GYP	ID gene	Mutações (Gene)	Mutações (Nº da base - Troca)	Mutações (Proteínas)	Mutações (Nº do Aminoácido - Troca)
1.	LA2847 (LA_RS11770)	9	007 - T/C 336 - G/A 468 - T/C 537 - T/C 705 - C/T 837 - T/C 1412 - G/A 1470 - C/T 1686 - C/T	1	3 - S/P 471 - R/K
2.	LA2383 (LA_RS09925)	10	255 - G/A 558 - A/G 681 - A/G 903 - C/T 918 - C/T 936 - T/C 975 - T/C 978 - A/G 993 - T/C 1038 - A/G	0	0
3.	LA0156 (LA_RS00715)	1	414 - C/T	0	0
4.	LA0153 (LA_RS00710)	5	177 - A/G 351 - T/C 750 - C/T 969 - A/G 1113 - C/A	0	0

Anexo f - Tabela suplementar 6 - Valores de ANI (%) para comparação entre as cepas isoladas a partir de amostras cães, roedor e humano, obtidas no mesmo cenário epidemiológico. As comparações foram realizadas usando BLASTn, (BLAST+), parâmetro ANIb

	C20	C29	C51	C82	R062	L1-130
C20	1.0					
C29	0.9995671648449698	1.0				
C51	0.9995317317563044	0.9996664378724345	1.0			
C82	0.999426302071731	0.9996359775181839	0.9995414342895265	1.0		
R062	0.998858706333108	0.9988209131403119	0.9989321610074207	0.9990473252416274	1.0	
L1-130	0.9994077408563782	0.9996279099536526	0.9995555231522707	0.9997296639964398	0.9995128481297882	1.0

As sequências das cepas L1-130 e R062 podem ser encontradas com os números de acesso GCF_000007685 e SRX1274269 respectivamente.

Continua

Número do experimento	Cepa	Sorovar	Região de origem	Data de coleta	Hospedeiro
SRX236906	P2431	Copenhageni	Azores	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055244	Fiocruz LV2959	Copenhageni	Brasil: Itaparica	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236775	Fiocruz LV4212	Copenhageni	Brasil: Itaparica	-	<i>Homo sapiens</i>
Esse Trabalho	C20	Copenhageni	Brasil: Salvador	03.07.13	<i>Canis lupus familiaris</i>
Esse Trabalho	C29	Copenhageni	Brasil: Salvador	16.12.13	<i>Canis lupus familiaris</i>
Esse Trabalho	C51	Copenhageni	Brasil: Salvador	07.07.15	<i>Canis lupus familiaris</i>
Esse Trabalho	C82	Copenhageni	Brasil: Salvador	26.02.18	<i>Canis lupus familiaris</i>
SRX055210	Fiocruz LV2759	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055212	Fiocruz LV2763	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055217	Fiocruz LV2772	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055219	Fiocruz LV2776	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055221	Fiocruz LV2787	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055222	Fiocruz LV2790	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055223	Fiocruz LV2791	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055231	Fiocruz LV2812	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055251	Fiocruz LV3323	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055257	Fiocruz LV3879	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX1154223	Fiocruz LV4289	Copenhageni	Brasil: Salvador	2011	<i>Homo sapiens</i>
SRX1156805	Fiocruz LV4102	Copenhageni	Brasil: Salvador	2010	<i>Homo sapiens</i>
SRX1156808	Fiocruz LV4157	Copenhageni	Brasil: Salvador	2010	<i>Homo sapiens</i>
SRX1156979	Fiocruz LV4241	Copenhageni	Brasil: Salvador	2011	<i>Homo sapiens</i>
SRX1156981	Fiocruz LV4278	Copenhageni	Brasil: Salvador	2011	<i>Homo sapiens</i>
SRX1160351	Fiocruz LV4361	Copenhageni	Brasil: Salvador	2011	<i>Homo sapiens</i>
SRX1160352	Fiocruz LV4457	Copenhageni	Brasil: Salvador	2012	<i>Homo sapiens</i>
SRX1160353	Fiocruz LV4497	Copenhageni	Brasil: Salvador	2012	<i>Homo sapiens</i>
SRX1162756	Fiocruz LV4498	Copenhageni	Brasil: Salvador	2012	<i>Homo sapiens</i>
SRX1274269	Fiocruz R062	Copenhageni	Brasil: Salvador	1998	<i>Rattus norvegicus</i>
SRX1274569	Fiocruz R070	Copenhageni	Brasil: Salvador	1998	<i>Rattus norvegicus</i>
SRX1274570	Fiocruz R082	Copenhageni	Brasil: Salvador	1998	<i>Rattus norvegicus</i>
SRX1295493	Fiocruz R085	Copenhageni	Brasil: Salvador	1998	<i>Rattus norvegicus</i>
SRX236213	Fiocruz LV4118	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236415	Fiocruz LV4152	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236416	Fiocruz LV2919	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236417	Fiocruz LV3076	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236418	Fiocruz LV4188	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236419	Fiocruz LV4034	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236691	Fiocruz LV2807	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236692	Fiocruz LV2816	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236693	Fiocruz LV4211	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236694	Fiocruz LV4234	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236695	Fiocruz LV237	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236696	Fiocruz LV4108	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236777	Fiocruz LV4217	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236778	Fiocruz LV4174	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX236905	Fiocruz LV4160	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX237028	Fiocruz LV2766	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX237227	Fiocruz LV4113	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055279	Fiocruz LV251	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055288	Fiocruz LV2755	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055206	Fiocruz 2756 C1	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX055253	Fiocruz LV3726	Copenhageni	Brasil: Salvador	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX237224	Fiocruz LV2841	Copenhageni	Brasil: Simões Filhos	-	<i>Homo sapiens</i>
SRX1295494	CIDEIM R081	Copenhageni	Colômbia	2004	<i>Rattus norvegicus</i>
SRX1295495	CIDEIM R107	Copenhageni	Colômbia	2004	<i>Rattus norvegicus</i>

Anexo g - Tabela suplementar 7 - Informações gerais de todas as sequências de *L. interrogans* sorovar Copenhageni utilizadas para a construção da árvore filogenética baseada em SNPs

Conclusão

Número do experimento	Cepa	Sorovar	Região de origem	Data de coleta	Hospedeiro
SRX236690	2006006982	Copenhageni	Egito	2006	<i>Homo sapiens</i>
SRX237223	2006006972	Copenhageni	Egito	2006	<i>Homo sapiens</i>
SRX1305355	200803290	Copenhageni	França	2008	<i>Homo sapiens</i>
SRX1305356	200903008	Copenhageni	Polinésia Francesa	2009	<i>Homo sapiens</i>
SRX1305357	201000930	Copenhageni	Polinésia Francesa	2010	<i>Homo sapiens</i>
SRX1305358	200700457	Copenhageni	Guadalupe	2007	<i>Homo sapiens</i>
SRX236907	201100516	Copenhageni	Guadalupe	2011	<i>Homo sapiens</i>
SRX237198	2007005490	Copenhageni	EUA: Havaí	2007	<i>Homo sapiens</i>
SRX237215	2002009669	Copenhageni	EUA: Havaí	2002	<i>Homo sapiens</i>
GCF_000007685*	L1-130	Copenhageni	Brasil: Salvador	1996	<i>Homo sapiens</i>
GCF_000092565*	56601	Lai	-	-	-

- = dados não disponibilizados nas informações de metadados ou publicações relacionadas; * numeração da montagem do genoma.

Anexo h - Durante o período do doutorado colaborei em outros nove trabalhos, nos quais sou autor ou coautor, seguem abaixo:

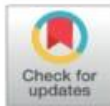
RESEARCH ARTICLE

Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse

Daniela Santos Almeida¹, Lucas Nogueira Paz¹, Daiana Santos de Oliveira², Danielle Nascimento Silva¹, Paula Ristow³, Camila Hamond⁴, Federico Costa⁵, Ricardo Wagner Portela⁶, Alessandra Estrela-Lima¹, Melissa Hanzen Pinna^{1*}

1 Post Graduate Program in Animal Science in the Tropics—Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil, **3** Laboratory of Bacteriology and Health, Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **4** Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, **5** Instituto de Saude Coletiva, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, **6** Instituto de Ciências da Saúde, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

* melissahp@ufba.br



OPEN ACCESS

Citation: Almeida DS, Paz LN, de Oliveira DS, Silva DN, Ristow P, Hamond C, et al. (2019) Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. PLoS ONE 14(5): e0217391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217391>

Editor: Kalimuthusamy Natarajaseenivasan, Bharathidasan University, INDIA

Received: August 14, 2018

Accepted: May 11, 2019

Published: May 23, 2019

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by the Foundation for Research Support of the State of Bahia, Brazil (<http://www.fapesb.ba.gov.br/>), Public Notice no. 025/2010 under Term of Grant PPP 0034/2011, coordinated by Melissa Hanzen Pinna. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The study aimed to evaluate the histopathological characteristics of renal lesions in chronically infected sheep and with low titers of anti-*Leptospira* antibodies from a slaughterhouse. In the serological analysis, 24.74% (48/194) presented seroreactivity with a titer equal to or greater than 100. Among these seroreactive sheep, titers of 100 were predominant (58.33%, 28/48), with the highest titer being 1,600 (2.08%, 1/48). Serogroup Sejroe (sv. Hardjo) was the most frequent at 35.42% (17/48). Leptospiral DNA was verified in 4.12% (8/194) of the kidney samples tested, and no urine sample was positive. All the samples corresponded to the pathogenic species *L. interrogans*. The eight amplicons with 202-nucleotides were identical with two mismatches (presented 100% of identity) using the PCR targeting to *secY* gene. Histological sections of PCR-positive kidneys were submitted to direct detection by the anti-LipL32 immunohistochemistry (IHC) technique. The *Leptospira* spp. antigen was evident in 62.5% (5/8) of the kidneys. Positive staining was observed in the cytoplasm of tubular cells and in the form of brownish aggregates that adhered to tubular epithelial cells and projected into the lumen. Inflammatory lymphoplasmacytic infiltrate, ranging from mild to moderate, with multifocal distribution, was the predominant finding in seroreactive animals (33.33%, 16/48). The demonstration of the leptospiral antigen lining the renal tubules through IHC of naturally infected sheep confirmed by PCR characterizes renal colonization in a species with the presence of histological changes compatible with leptospirosis.

Introduction

Leptospires live in the wild in mammalian reservoirs, which are chronically infected in the kidneys and eliminate the bacteria in the urine, polluting the environment [1]. Rodents are

Original Contribution

Detection of *Leptospira* spp. in Captive Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*)

Lucas Nogueira Paz,¹ Camila Hamond,² Carla Silva Dias,¹ Vitor P. Curvelo,³ Marco Alberto Medeiros,⁴ Arianne Pontes Oriá,¹ and Melissa Hanzen Pinna¹

¹School of Veterinary Medicine and Zootechnology, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

²Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Ruta 50, Km. 11, Colonia, Uruguay

³Getúlio Vargas Zoobotanic Park, Salvador, BA, Brazil

⁴Laboratory of Recombinant Technology, Bio-Manguinhos, Brazilian Ministry of Health, FIOCRUZ, Av. Brazil, 4365, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Abstract: *Leptospira* sp. is an important waterborne zoonotic bacterium, known to cause infection in animals and humans worldwide. The role of reptiles in the transmission of this microorganism is poorly understood and historically neglected. This study aimed to investigate the presence of anti-*Leptospira* spp. antibodies and leptospiral DNA in captive *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). Of the 23 reptiles studied by microscopic agglutination test (MAT), 22/23 (95.65%) were considered reactive (titers ≥ 100) and 1/23 (4.35%) non-reactive (titer < 100). The serogroup with highest occurrence was Grippotyphosa (68.18%, $n = 15/22$) followed by serogroup Djasiman (18.18%, $n = 4/22$). Specific amplification of *Leptospira* spp. gene *lipL32* was observed in six (26.09%, $n = 6/23$) blood samples. Five of six samples, previously detected as pathogenic leptospira by PCR, were amplified and sequenced. All the samples corresponded to the pathogenic species *Leptospira interrogans* (presented 100% of identity) using the PCR targeting to *secY* gene. We demonstrated high detection of DNA of *L. interrogans* in crocodylians, and the authors suggest that further research is needed to elucidate the impact of *Leptospira* spp. infection in health broad-snouted caimans as well as the pathophysiology of leptospirosis in crocodylians.

Keywords: Reptiles, Leptospirosis, Zoonosis, Crocodylian, Diagnosis

INTRODUCTION AND PURPOSE

Leptospirosis is a widespread zoonotic disease of great importance for public health (Adler and de La Peña

Moctezuma 2010; Costa et al. 2015). Currently, the classification of the genus *Leptospira* is more complete with 65 species described, subdivided into four subclades: P1 (19 species) as pathogens, P2 (21 species) as intermediates, S1 (21 species) as saprophytes and S2 as a new subclade (with three new species plus *L. idonii*) (Casanovas-Massana et al. 2019; Vincent et al. 2019).

Caiman latirostris (Reptilia, Alligatoridae), genus *Caiman* sp., popularly known as broad-snouted caiman, inhabits a wide range of environments—drains, highly

Electronic supplementary material: The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10393-019-01452-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Melissa Hanzen Pinna, e-mail: melissahp@ufba.br

Published online: 07 November 2019



Leptospira interrogans in wild *Boa constrictor* snakes from Northeast Brazil peri-urban rainforest fragments

Gustavo M. Rodamilans^a, Maisa Santos Fonseca^a, Lucas N. Paz^b, Clara C. Fernandez^a, Ilka Biondi^c,
Rejane M. Lira-da-Silva^d, Roberto Meyer^d, Melissa H. Pinna^e, Ricardo D. Portela^{a, *}

^a Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40110-100, Brazil

^b Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40170-100, Brazil

^c Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia State, 44036-960, Brazil

^d Núcleo de Ofitologia e Animais Peçonhentos da Bahia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40170-290, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leptospirosis
Zoonosis
Wildlife
Reptiles
Snakes

ABSTRACT

Leptospirosis, a disease that occurs worldwide, especially in tropical regions, is caused by bacteria of the genus *Leptospira* and affects mammals, amphibians, and reptiles. *Boa constrictor* snakes are commonly found in Atlantic rainforest fragments in peri-urban areas, which indicates a greater possibility of the contact of these animals with humans residing there. Therefore, the aim of this work was to detect *Leptospira* spp infection through molecular assays in wild *B. constrictor* snakes rescued in peri-urban areas and verify seroreactivity, by the microscopic agglutination test (MAT), as well as the most common serogroups. Among the 46 samples tested, 7 (15.21%) were positive according to PCR and confirmed as *Leptospira interrogans* through *secY* gene sequencing. In MAT, 37 (80.43%) of the 46 samples were classified as reactive. Panama was the serogroup with the highest occurrence. The results showed the presence of *Leptospira* spp DNA in asymptomatic snakes rescued in rainforest fragments located in peri-urban areas and support further investigations on the influence of these animals in the epidemiology of leptospirosis in tropical peri-urban areas.

1. Introduction

Urban growth and deforestation can cause greater contact between humans and wild animals, favoring the occurrence of emerging and re-emerging diseases (Hassell et al., 2017). Urbanization alters the composition of ecological communities by changing habitat quality, animal dispersal capacity, and nutrient availability (Gottdenker et al., 2014), which may increase the host's susceptibility to infection by pathogens owing to chronic stress and/or immunosuppression (Keesing et al., 2010).

Leptospirosis is caused by bacteria of the genus *Leptospira* and uses mammals, reptiles, and amphibians as hosts in Latin America (Vieira et al., 2018). Domestic, synanthropic and wild animals are considered the main reservoirs and are responsible for the persistence of infection foci (Rodrigues et al., 2016). Several wild animals can act as hosts, although some species are neglected in the epidemiology of this zoonosis (Vieira et al., 2018; Paz et al., 2019).

Boa constrictor (LINNAEUS, 1758) snakes have a wide distribution in the Americas, being commonly found in peri-urban rainforest fragments (Navega-Gonçalves and Porto, 2016), feeding on small mammals,

lizards, amphibians, and birds (Pizzatto et al., 2009; Cabral et al., 2019). They are considered to be of no medical importance owing to their non-venomous nature; therefore, they are neglected as reservoirs of pathogens with zoonotic potential, such as fungi, viruses, and bacteria (Mitchell, 2011).

Considering the scarcity of studies that show the detection of *Leptospira* spp. in snakes, as well as the high number of rescues of these animals in tropical peri-urban areas, the aim of this work was to detect infection by *Leptospira* spp. and their respective serogroups in wild *B. constrictor* rescued in the Brazilian Northeast Region.

2. Material and methods

2.1. Ethical aspects

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia (CEUA / UFBA 94/2018), by the System on Biodiversity Authorization (SISBIO 63,053-3) and by the National System on Genetic Resources Management (SISGEN A789EC8).

* Corresponding author at: LABIMUNO-UFBA, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, Bahia State, 40110-100, Brazil

E-mail addresses: rejane@ufba.br (R.M. Lira-da-Silva), rmeyer@ufba.br (R. Meyer), melisabp@ufba.br (M.H. Pinna), rwportela@ufba.br (R.D. Portela).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105572>

Received 31 March 2020; Received in revised form 31 May 2020; Accepted 31 May 2020

Available online 03 June 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Unusual case of polyarthritis and hepatorenal syndrome associated with *Leptospira interrogans* infection in a dog: A case report

Lucas Nogueira Paz^a, Carla Silva Dias^b, Vitor Moraes Pina de Carvalho^b, Caterina Muramoto^c,
Alessandra Estrela-Lima^b, Melissa Hanzen Pinna^{b,*}

^a Bacterial Disease Laboratory (LABAC) - Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

^b Laboratory of Veterinary Pathology - Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

^c Diagnostic Imaging - Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leptospirosis
Canine
Infective arthritis
Diagnosis

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by spirochetal bacterial of the genus *Leptospira* affecting virtually all mammals. The infection has a broad range of effects, from mild clinical manifestation to multiple organ failure, and ultimately death. A 5-months-old male unvaccinated dog was admitted to the University Veterinary Teaching Hospital presenting dullness, dehydration, jaundiced mucous, bloody diarrhea, vomiting, and hyporexia. Microscopic agglutination test (MAT) detected serological titers of 1:1.600 for serogroup Canicola. After five days of monitoring by the medical team he developed fever and swelling of carpal and tarsal joints, accompanied by functional limitation. Initial antimicrobial treatment was instituted for leptospirosis. Polyarthritis responsiveness to glucocorticoid therapy was observed through decreasing signs of inflammation of the affected joints. The diagnosis of leptospirosis was further confirmed by molecular investigation for *Leptospira* spp. on blood and synovial fluid samples. Amplification and sequencing of the *secY* partial gene characterized the infective bacterial as *Leptospira interrogans*. From the 7th day the respiratory condition worsened and on Day 14 the patient evolved to death, when necropsy and histological evaluation were performed. Prominent anatomopathological findings included: fibrinous polyarthritis, bronchointerstitial pneumonia, intense hepatocyte dissociation, cholestasis, and periportal multifocal hepatitis, diffuse acute tubular necrosis, and significant dystrophic mineralization in the renal parenchyma, lungs, and atrial endocardium. Here, we present a case report of systemic clinical manifestations polyarthritis associated with the presence of leptospires in the synovial fluid. We highlight the need for richer knowledge about the different clinical manifestations of leptospirosis.

1. Introduction

Leptospirosis is a widely distributed zoonotic disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira* (Costa et al., 2015). Pathogenic leptospires infection in dogs can be accompanied by a wide range of clinical manifestations, however, acute kidney injury, hepatic impairment, pulmonary hemorrhage, and hemorrhagic diathesis are most commonly reported (Schuller et al., 2015b). Institution of early diagnosis and therapy can increase survival rates by approximately 80%, contrarily, in more severe cases mortality rates can reach 70% (Kohn et al., 2010).

Human and animal literature described unusual manifestations of leptospirosis with variable respiratory signs and consequent pulmonary

hemorrhage syndrome (Schonfeld et al., 2019; S Schuller et al., 2015a, 2015b). Other reported affections include nervous system manifestations (Tomaeruz et al., 2019), pancreatitis (Daher et al., 2003; Schuller et al., 2015a), gastric disease with intussusception (Schweighauser et al., 2009), and reproductive disorders with consequent abortion and infertility (Rossetti et al., 2005; Schuller et al., 2015b). Kidney insufficiency and dysfunction are common characteristics in canine leptospirosis, consequences of interstitial tubular nephritis, glomerulonephritis, vasculitis and decreased renal perfusion (Goldstein, 2010; Schuller et al., 2015b). The literature described an unusual and rare case of human multiorgan dysfunction manifestation of leptospirosis involving acute myocarditis, pancreatitis, polyarthritis, mononeuritis multiplex, and severe vasculitis with necrosis of the extremities (Panagopoulos

* Corresponding author at: School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, Adhemar de Barros Avenue, 500, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil.

E-mail addresses: lucasnpaz@hotmail.com (L.N. Paz), cmuramoto@ufba.br (C. Muramoto), melissahp@ufba.br (M.H. Pinna).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.006>

Received 19 August 2020; Received in revised form 8 December 2020; Accepted 18 December 2020

Available online 22 December 2020

0034-5288/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Kidney Injury Molecule-1 in the detection of early kidney injury in dogs with leptospirosis

C.S. Dias^a, L.N. Paz^a, M.S. Solcà^b, R.W.D. Portela^c, M.V. Bittencourt^a, M.H. Pinna^{a,*}^a Bacterial Disease Laboratory, Federal University of Bahia, 500 Adhemar de Barros Av., Salvador, BA 40170-110, Brazil^b Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production of the School of Veterinary Medicine and Zootecny, Federal University of Bahia, 500 Adhemar de Barros Av., Salvador, BA 40170-110, Brazil^c Laboratory of Immunology and Molecular Biology, Health Science Institute, Federal University of Bahia, Rector Miguel Calmon Av., Salvador, BA 40140-100, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leptospirosis
KIM-1
Kidney damage
Urinary biomarker
Dog

ABSTRACT

Renal damage, a common feature in canine leptospirosis, ranges from a subclinical affection to kidney dysfunction and death. Chances of recovery can be improved by early intervention. However, traditional biomarkers (serum urea and creatinine) have limited relevance for precocity. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) is a transmembrane protein upregulated in early stages of tubular injury. This study evaluated the use of urinary KIM-1 to detect early renal injury in naturally occurring canine leptospirosis. This exploratory research included 30 dogs divided into two groups: (1) dogs with leptospirosis ($n = 25$) and (2) healthy dogs ($n = 5$). *Leptospira* sp. infection was diagnosed through urine PCR and/or direct bacteriologic culture and/or serology (single MAT titers ≥ 800). Additionally, stage of infection was further characterized in acute and subacute phases based on the onset of clinical symptoms from 3 to 7 days. Urinary KIM-1 (uKIM-1) concentrations were measured in both groups with a commercial canine ELISA kit.

uKIM-1 levels were statistically different ($P < 0.01$) between the studied groups, especially in non-azotemic dogs ($P = 0.0042$). The biomarker showed 88 % sensibility to diagnosis of kidney injury at > 1.49 ng/mL cut-off. Urine KIM-1 was negatively correlated with urine specific gravity (USG) but accompanied histopathological evidence of renal degeneration, necrosis and regeneration processes, extending information on kidney health. Measurement of KIM-1 in the urine of canine patients was able to detect naturally occurring acute and subacute leptospirosis accompanied by tubular injury in early non-azotemic infections.

1. Introduction

Leptospirosis is a remerging zoonosis of worldwide distribution, highly relevant to public health, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* [1,18]. The mechanisms of leptospiral pathogenesis have not been fully elucidated, however the infection is characterized by multisystemic disorders [2]. Canine leptospirosis is clinically consistent with renal and hepatic involvement accompanied by nonspecific and diverse clinical signs [3]. Renal involvement constitutes an important aspect in canine leptospirosis. Spirochetes colonize the proximal tubules and in acute cases the renal injury might progress to kidney dysfunction [2].

Despite being fatal in canine patients, an appropriate early intervention enables fully recovery, reduces the probability of renal colonization and damage to the kidneys and liver [4–6]. Once the infection is

diagnosed it is important to determine the existence and the degree of kidney damage. However, conventional markers such as serum urea and creatine (sCr) lack in diagnostic precocity and specificity, increased concentrations are only detected when a significant portion of the nephron is severely damaged [7]. Additionally, renal injury can be present in the absence of kidney dysfunction [8].

Early and specific detection of renal injury facilitates the diagnosis of kidney disease, enables timely therapeutic intervention, and prevents additional treatment expenses [9]. In human medicine the search for early biomarkers led to the identification of Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a transmembrane glycoprotein, not expressed in the absence of renal damage; gene expression and urine shedding are both rapidly upregulated following tubular injury [10]. Urinary KIM-1 (uKIM-1) measurement was reproducible in different models of renal injury in different species – humans, dogs and rodents [11–15]. Still, in veterinary

* Corresponding author.

E-mail address: melissahp@ufba.br (M.H. Pinna).<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101637>

Received 27 November 2020; Received in revised form 23 February 2021; Accepted 24 February 2021

Available online 1 March 2021

0147-9571/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Multidisciplinary approach in the diagnosis of acute leptospirosis in dogs naturally infected by *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae: A prospective study

Lucas Nogueira Paz^a, Carla Silva Dias^a, Daniela Santos Almeida^a, Ilana Teruszkin Balassiano^b, Marco Alberto Medeiros^c, Federico Costa^{d,e,f,g}, Danielle Nascimento Silva^h, Joice Neves Reisⁱ, Alessandra Estrela-Lima^h, Camila Hamond^a, Melissa Hanzen Pinna^{h,*}

^a Bacterial Disease Laboratory, Postgraduate Program in Animal Science in Tropic - Federal University of Bahia, Ademar de Barros av, 500, 40170-110, Salvador, BA, Brazil

^b Bacterial Zoonoses Laboratory, Leptospira National Reference Center/Leptospira collection, WHO/PAHO Collaborating Center for Leptospira, Department of Bacteriology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Brazil av, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratory of Recombinant Technology, Bio-Manguinhos, Brazilian Ministry of Health, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

^d Collective Health Institute, UFBA, Ruafo de Garça s, 40110-000, Candeia, Salvador, BA, Brazil

^e Centro de Pesquisas Gonçalo Moreira, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil

^f Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK

^g Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA

^h Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinical Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

ⁱ Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Bahia / UFBA, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Anemia
 Canine
 Leptospira
 Nephritis

ABSTRACT

Leptospirosis, a zoonotic disease with worldwide distribution, is caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. In dogs, this disease is frequently misdiagnosed. Few studies have attempted to associate the detection of *Leptospira* spp. infection with clinicopathological and renal histopathological findings using a multidisciplinary approach. The present study isolated and characterized *Leptospira* spp. obtained from naturally infected dogs and described relevant clinical and histopathological findings. Blood and urine were collected from 57 dogs with clinical symptomatology suggestive of leptospirosis; 38 cases were confirmed by PCR in urine or by culture or microscopic agglutination testing (titers ≥ 800). A total of 12 strains of pathogenic *Leptospira* were isolated from the studied dogs (seven in blood, four in urine and one in both blood and urine samples). All isolates were characterized as *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. Of the confirmed cases, almost one-third of the animals had been vaccinated. Our analysis of laboratory testing revealed that anemia and proteinuria were statistically significant predictors of infection. The main histopathological findings seen in kidney tissues were necrosis, degeneration, tubular regeneration, mononuclear inflammatory infiltrate and congestion. A multidisciplinary approach involving clinicopathological and histopathological characterization of renal involvement can aid in the identification of acute leptospirosis infection.

1. Introduction

Leptospirosis, a neglected tropical disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira* [1], can greatly impact the health of both humans and animals. Dogs face significant exposure to leptospires, due to high contact with rodents and contaminated environments. The clinical diagnosis of canine leptospirosis is often hampered by non-specific signs

of infection, and the severity of disease is directly linked to individual immune response [2]. The most frequent clinical signs of leptospirosis include fever, prostration, jaundice, abdominal pain, vomiting, polyuria/polydipsia and anuria/oliguria [3–5].

Infective serovars vary among canine populations in accordance with exposure to infected animals (wild or domestic), reservoir species and geographic region [6,7]. The determination of this information is

* Corresponding author.

E-mail address: melissahp@ufba.br (M.H. Pinna).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101664>



Received 14 December 2020; Received in revised form 5 April 2021; Accepted 14 April 2021

Available online 7 May 2021

0147-9571/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Comment

Detection of *Leptospira interrogans* DNA in Urine of a Captive Ocelot (*Leopardus pardalis*)

 Lucas N. Paz  Camila Hamond and Melissa H. Pinna * 

Bacterial Disease Laboratory (LABAC), School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, Adhemar de Barros Avenue, 500, Salvador 40170-110, Brazil; lucaspaz@hotmail.com (L.N.P.); camilahamond@gmail.com (C.H.)

* Correspondence: melissahp@ufba.br; Tel.: +55-(71)-32836749

Dear editor,

We read with interest the article recently published by Murillo and collaborators (2020) [1] in *The International Journal of Environmental Research and Public Health*. The main objective of the study was to evaluate the presence of antibodies against pathogenic *Leptospira* species and the prevalence of pathogenic *Leptospira* DNA in the urine and blood in stray cats in Spain. According to the authors, 4.1% of the animals were seropositive for *Leptospira* spp. (cutoff = title of 20). One sample (1.12%) was positive for the detection of *Leptospira* DNA. It is noteworthy that this cat did not have antibodies against *Leptospira* detected by MAT.

Anti-*Leptospira* antibodies have been described in domestic cats [1–3] and free-living felines worldwide [4–6]. In Brazil, studies with different species of wild felines, free-living or captive, have shown the exposure of leptospires in these animals, which vary from 2.5% to 18.2% [4,7,8]. These studies are notable for characterizing the circulation of *Leptospira* in a large neotropical felines species from different epidemiological settings. However, in order to characterize chronic carrier animals, it is necessary to investigate the presence of DNA or obtain leptospiral isolates from urine or kidney samples [9].

In recent years, studies have demonstrated the presence of leptospire DNA in the urine and blood of domestic cats [1,3]. Additionally, Alashraf and collaborators (2020) [10] describe, for the first time, the recovery of *Leptospira interrogans* from urine and kidney samples from naturally infected domestic cats. Such results demonstrate the possibility that domestic cats act as chronic carriers of *Leptospira* ssp. Studies that characterize wild animals, especially wild felines, as chronic carriers are rare in the literature. Here, we describe for the first time the presence of *Leptospira* spp. DNA recovered from the urine of a naturally infected captive ocelot (*Leopardus pardalis*) and without clinical symptoms of leptospirosis. This study was carried out as part of the routine surveillance conducted by the Park's veterinary team.

The microscopic agglutination test (MAT) was performed as recommended by the World Organization for Animal Health [11], using a panel composed of 19 serogroups (Table S1). In MAT, reactivity was observed with the titer of 25 for serovar Canicola. For direct identification of the agent, the amplification was primarily directed towards the detection of the *lipL32* gene (present only in pathogenic *Leptospira* species). Then, the *secY* housekeeping gene (responsible for determining the *Leptospira* species) was amplified and the amplicons were purified and sequenced as described by Paz and collaborators (2019) [12]. Genotyping based on the partial *secY* gene characterized the infecting bacteria as *Leptospira interrogans* (GenBank accession number MW013523). Phylogenetic analysis was performed with Mega v6 software using the neighbor-joining method. The phylogenetic tree (Figure 1) was built using the Tamura–Nei model [13].



Citation: Paz, L.N.; Hamond, C.; Pinna, M.H. Detection of *Leptospira interrogans* DNA in Urine of a Captive Ocelot (*Leopardus pardalis*). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 793. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020793>

Received: 9 October 2020
 Accepted: 15 January 2021
 Published: 19 January 2021


Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Serological survey of leptospirosis, brucellosis, and lentivirus in herds of small ruminants in Recôncavo Baiano, Bahia, Brazil

Inquérito sorológico de leptospirose, brucelose e lentivirose em rebanhos de pequenos ruminantes no Recôncavo Baiano, Bahia, Brasil

Rodrigo Rezende Mires de Carvalho¹; Lucas Nogueira Paz²; Carla Silva Dias¹; Giselle Almeida Nocera²; Augusto José Pereira de Mesquita³; Melissa Hanzen Pinna⁴ 

¹Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Salvador – BA, Brazil

²Instituto de Tecnologia do Paraná, Diretoria de Produção, Curitiba – PR, Brazil

³Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, Laboratório de Defesa e Saúde Animal, Salvador – BA, Brazil

⁴Universidade Federal da Bahia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, Laboratório de Bacterioses, Salvador – BA, Brazil

ABSTRACT

A serological survey was carried out to assess the frequency of leptospirosis, small ruminants lentivirus (SRLV), and brucellosis in small ruminant herds in the Recôncavo Baiano, State of Bahia, Brazil, from February to December 2017. In four goat herds, 125 animals were tested for SRLV and leptospirosis, while in five sheep herds, 378 animals were tested for leptospirosis, brucellosis, and SRLV. Regarding leptospirosis, MAT detected 80% of goats and 15.34% of sheep seroreactive. Reactivity was most frequent to serogroups Autumnalis and Grippotyphosa in goats and sheep, respectively. Regarding SRLV, 8.8% of goats and 0.79% of sheep were reactive. Search for anti-*B. ovis* antibodies revealed 0.52% reactivity. In sheep, three animals showed simultaneous seroreactivity for SRLV and leptospirosis, while one animal had a serological response for brucellosis and leptospirosis. In goats, simultaneous seroreactivity for SRLV and leptospirosis was observed in only one animal. Leptospirosis was the most frequent of the three infectious diseases in investigated herds.

Keywords: Diagnosis. Reproductive changes. *Leptospira* spp. Caprine arthritis-encephalitis. Maedi-Visna. *Brucella ovis*.

RESUMO

Foi realizado um inquérito sorológico para avaliar a frequência de ocorrência de leptospirose, lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR) e brucelose em rebanhos de pequenos ruminantes no Recôncavo Baiano, estado da Bahia, Brasil, no período de fevereiro a dezembro de 2017. Em quatro rebanhos de caprinos, foram testados 125 animais para LVPR e leptospirose, enquanto em cinco rebanhos de ovinos, foram testados 378 animais para leptospirose, brucelose e LVPR. Em relação à leptospirose, 80% das cabras e 15,34% das ovelhas foram sororreativas. Os sorogrupos de *Leptospira* spp. predominantes foram Autumnalis e Grippotyphosa para caprinos e ovinos, respectivamente. Em relação às LVPR, 8,8% dos caprinos e 0,79% dos ovinos foram reativos. Adicionalmente, a pesquisa de anticorpos Anti-*B. ovis* revelou 0,52% de ovinos reativos. Em ovinos, três animais apresentaram sororreatividade simultânea para LVPR e leptospirose, enquanto um animal teve resposta sorológica para brucelose e leptospirose. Em caprinos, sororreatividade simultânea para LVPR e leptospirose foi observada em apenas um animal. A leptospirose foi a doença infecciosa mais frequente nos rebanhos investigados.

Palavras-chave: Diagnóstico. Alterações reprodutivas. *Leptospira* spp. Artrite encefalite caprina. Maedi-Visna. *Brucella ovis*.



Short Communication

Detection of *Leptospira interrogans* in Wild Sambar Deer (*Rusa unicolor*), Brazil

Lucas Nogueira Paz,¹ Camila Hamond,¹ and Melissa Hanzen Pinna^{1,2}

¹Bacterial Disease Laboratory (LABAC), School of Veterinary Medicine and Zootecny, Federal University of Bahia, Adhemar de Barros - AV, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-11, Brazil

²Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brazil

Abstract: Leptospirosis is an emerging zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Wild animals may present acute disease or become chronic hosts. The present study aimed to identify *Leptospira* spp. infection and determine circulating serogroups in free-ranging sambar deer (*Rusa unicolor*) in a fragment of peri-urban tropical forest in northeastern Brazil. Blood samples were collected and subjected to microscopic agglutination testing (MAT) and PCR analysis (genes *lipL32* and *saxY*). Anti-*Leptospira* antibodies were detected in 60% of the animals tested, with serogroups Cynopteri (33.4%), Hebdomadis (22.2%) and Grippotyphosa (22.2%) identified as most prevalent. DNA corresponding to the pathogenic species *Leptospira interrogans* was detected in 2/15 (13.3%) of the samples tested. Sambar deer experience a high level of exposure to *Leptospira* spp. in our epidemiological setting. It is important to emphasize the implementation of effective measures (i.e., maintaining habitats and reducing human contact) for the conservation of endangered species.

Keywords: cervids, diagnosis, leptospirosis, wildlife, zoonosis

INTRODUCTION

Emerging and reemerging diseases have become an intense topic of discussion for public health authorities in recent years. It is estimated that around 70% of all infectious diseases affecting humans are caused by zoonotic agents (Jori et al. 2014; Garba et al. 2018). Leptospirosis, a ne-

glected zoonotic disease with worldwide distribution, is caused by bacteria of the genus *Leptospira*, affecting not only a wide range of domestic animals, but also wild animals and humans. Annual cases of human leptospirosis total approximately 1.03 million worldwide, resulting in around 59,000 deaths (Costa et al. 2015).

The literature contains scarce reports on the epidemiology of leptospirosis in wild animals (Fornazari et al. 2018). Most studies in cervids focus on anti-*Leptospira* antibodies (Cantu et al. 2008; Ayanegui-Alcérreca et al. 2010; Andreoli et al. 2014; Zimpel et al. 2015), yet relatively few have reported on neotropical cervids (Minervino et al. 2018). Isolates of *Leptospira* spp., as well as DNA, have been described in kidney and urine samples from different deer

Supplementary Information: The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10993-022-01577-9>.

Correspondence to: Melissa Hanzen Pinna, e-mail: melisahp@ufb.br

Published online: 19 February 2022