

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO



Trabalho Acadêmico

**TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Leptospira interrogans*  
ATRAVÉS DE VNTR E DETECÇÃO POR ELETROFORESE  
CAPILAR**

**MICHEL QUEVEDO FAGUNDES**

Pelotas, 2008

**MICHEL QUEVEDO FAGUNDES**

**TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Leptospira interrogans* ATRAVÉS DE VNTR E  
DETECÇÃO POR ELETROFORESE CAPILAR**

Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Ciências Biológicas-Bacharelado da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação do Prof. Dr. Odir A. Dellagostin.

Orientador: Dr. Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2008

**Banca examinadora:**

Dr. Éverton Fagonde da Silva

Dra. Fabiana Kömmling Seixas

Dra. Sibeles Borsuk

## DEDICATÓRIA

Á minha mãe Zoni, minha irmã Roberta, meus tios Émerson e Gisele e meus avós Osmar e Anira (*in memoriun*).

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Ao professor Odir A. Dellagostin pela sua orientação, pela confiança em minha capacidade, pela sua preocupação, paciência, dedicação e amizade, e pelo exemplo como pesquisador e professor.

À minha co-orientadora Fabiana Kömmling Seixas pela paciência, compreensão e acima de tudo pela amizade.

À minha mãe Zoni, pelos ensinamentos que me tornaram o que sou hoje, e minha irmã Roberta, pela eterna amizade e amor.

Aos amigos e colegas de laboratório de Biologia molecular, André, Daiane, Éverton, Gustavo, Róbson, Michele, Samuel, Sibebe, Silvana, Simone, Tessália, Vanessa e Vanusa, e os demais colegas do Centro de Biotecnologia e do curso de Ciência Biológicas agradeço pelo companheirismo, amizade, incentivo e auxílio.

Aos colegas e amigos da turma André, André, Camila, Lucas, Marco, Mariana e Mateus, pela amizade, companheirismo, ajuda e incentivo, sem vocês tudo teria sido mais difícil e menos prazeroso.

Aos bruxos da Embrapa, do Sítio e, é claro, do Campo do Carlito: Woods, Demônico, Pingola, Cabeção e K-olho por tantos momentos de alegria, noites de RPG e café e principalmente pela amizade, alegria e apoio sempre que necessário.

Aos amigos Maurício, Bin e JÁ, pela amizade incondicional e pelos ensinamentos que me ajudaram a escolher meu caminho (mesmo que eles achem que foi o errado!).

A FAPERGS e ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

**O meu muito Obrigado!**

*Para mi solo recorrer los caminos que tienen corazón, cualquier camino que tenga  
corazón.  
Por ay yo recorro, y la única prueba que vale es atravesar todo su largo. Y por ahí yo  
recorro mirando, mirando, sin aliento.*

*(Dom Juan, por Carlos Castañeda)*

A Erva do Diabo

## Resumo

### **Tipificação de isolados de *Leptospira interrogans* através de VNTR e detecção por eletroforese capilar**

FAGUNDES, Michel Quevedo. **Tipificação de isolados de *Leptospira interrogans* através de MLVA e detecção por eletroforese capilar**. 2008. 49f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

#### **M. Q. Fagundes.**

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

A leptospirose é zoonose de ampla distribuição mundial, endêmica de áreas tropicais. A espécie *Leptospira interrogans* é a mais encontrada em infecções humanas mundialmente, mas outras espécies como *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* também estão associadas com a leptospirose humana. Investigações epidemiológicas de leptospirose encontram problemas devido à complexa e lenta caracterização sorológica. Diversos métodos para a tipagem molecular de *L. interrogans* existem, um dos quais é análise de repetições em tandem de número variável (VNTR). Este método é baseado na separação e quantificação do tamanho de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) por eletroforese em gel de agarose, uma técnica de análise de baixa resolução. No presente trabalho, o VNTR descrito de *L. interrogans* foi aplicado a um painel de 42 isolados de *L. interrogans* de diferentes espécies de mamíferos e adaptado à eletroforese capilar. Com os resultados do gel de agarose, foi possível identificar três *primers* que em combinação caracterizaram todas as amostras à nível de sorovar. Estes *primers* foram utilizados para a análise por eletroforese capilar e mostraram-se equivalentes, e em alguns casos mais sensíveis que a análise através do gel de agarose. Dentre todas as amostras, foi possível identificar os sorovares Pomona A, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Kennewicki, com exatidão nos respectivos VNTR. O ensaio aqui apresentado permitiu uma caracterização rápida, automatizada e precisa de isolados de *L. interrogans* e representa um aperfeiçoamento sobre o atual método de análise baseado em gel de agarose.

Palavras-chave: *Leptospira*; Leptospirose; Genotipagem; Eletroforese capilar; Análise do número variável de repetições em tandem; VNTR.

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1:</b> Análise por PCR do polimorfismo dos lócus VNTR.....	33
<b>FIGURA 2:</b> Eletroferogramas representativos gerados pela separação dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar.....	34



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers dos loci VNTR de L. interrogans</i> .....	27
<b>Tabela 2.</b> Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.....	28
<b>Tabela 3.</b> Cepas de leptospiras isoladas no Brasil segundo espécie animal de origem e resultado do procedimento de tipificação por VNTR.....	31

## Sumário

Banca examinadora.....	2
Dedicatória.....	3
Agradecimentos.....	4
Resumo.....	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Sumário.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. A Leptospirose.....	11
1.1.1 Microbiologia.....	11
1.1.2 Taxonomia.....	13
1.1.3 Patogênese.....	13
1.1.4 Apresentação Clínica.....	15
1.1.5 Epidemiologia.....	15
1.1.6 Diagnóstico e Caracterização.....	16
1.1.7 Tratamento e Prevenção.....	18
1.1.8 Vacinas.....	18
1.1.9 Conclusões.....	19
2. Objetivo.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. Artigo.....	21
4. Conclusão.....	38
5. Referências Bibliográficas.....	39

Esta revisão abordará os principais aspectos desta doença, fazendo parte do trabalho de conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas-Bacharelado. A monografia está apresentada na forma de artigo científico, o que a nosso ver propicia uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos. O artigo trata da caracterização de isolados de *Leptospira interrogans* através da análise do número variável de repetições em tandem e detecção destas através de eletroforese capilar, quanto a sua capacidade de sensibilidade e rapidez. Este trabalho será submetido a um periódico da área de microbiologia.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 A leptospirose**

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* que são disseminadas na natureza através da urina contaminada de animais portadores de infecção crônica renal (FAINE *et al.*, 1999). A infecção humana ocorre diretamente através da exposição à bactéria no ambiente e usualmente ocorre distante do reservatório ou fonte animal. A enfermidade também pode estar relacionada a perdas econômicas na pecuária, devido a abortos, baixa na produção de leite, mamites e infecções inaparentes que comprometem a eficiência reprodutiva dos animais (BHARTI *et al.*, 2003; FAINE *et al.* 1999). Dentro das 18 espécies reconhecidas, encontram-se sorovares antigenicamente relacionados, que agrupam-se em sorogrupos. Aproximadamente 260 sorovares já foram descritos, distribuídos em 29 sorogrupos (GAMBERINI *et al.*, 2005). As leptospirosas penetram no hospedeiro através de pequenas escoriações ou abrasões na pele, ou ainda através da pele íntegra quando este permanecer por longos períodos em contato com águas contaminadas. Ao atingirem a corrente circulatória as leptospirosas multiplicam-se rapidamente. A fase de bacteremia pode durar de 1 a 7 dias, e é concomitante com o aparecimento de sintomas como febre e dores musculares (FAINE *et al.*, 1999; BHARTI *et al.*, 2003).

### 1.1.1 Microbiologia

Leptospiras são espiroquetas, um grupo de bactérias que divergiu cedo durante a evolução bacteriana (FAINE *et al.*, 1999). A família Leptospiraceae inclui dois gêneros, *Leptospira* e *Leptonema*. Historicamente, as leptospiras são classificadas de acordo com seus determinantes antigênicos (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Nos últimos anos, uma classificação molecular, baseada em experimentos de hibridização DNA-DNA reestruturou a taxonomia das leptospiras, mas continua sendo independente da tradicional classificação sorológica, a qual epidemiologistas e clínicos estão mais familiarizados (BHARTI *et al.*, 2003). São bactérias espiraladas e helicoidais, altamente móveis. A temperatura ótima de crescimento varia de 28 °C a 30 °C são aeróbios obrigatórios que partilham características de bactérias Gram negativas e Gram positivas e são catalase e oxidase positivos. Estas espiroquetas medem cerca de 0,25 µm x 6-25 µm em tamanho e um diâmetro de 0,45 µm (FAINE *et al.*, 1999). Possuem dois filamentos axiais com inserções polares localizadas no espaço periplasmático, sendo esta uma forma modificada de flagelo. Sua membrana dupla é semelhante à de outras espiroquetas, na qual a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicanos estão intimamente associadas e sobrepostas por uma membrana externa. Morfologicamente todas as leptospiras são indistinguíveis (FAINE *et al.*, 1999). A morfologia dos isolados varia com os cultivos *in vitro*, mas pode ser recuperada com passagens em hamsters (ELLIS *et al.*, 1983). Leptospiras são cultivadas em meios artificiais contendo 10% de soro de coelho ou 1% de albumina sérica bovina adicionada de ácidos graxos de cadeia longa. As culturas devem ser checadas de 4-5 dias para verificação de contaminantes e subcultivadas após 7-21 dias. Seu crescimento é lento, com o seu tempo de geração sendo de aproximadamente 12 horas (FAINE *et al.*, 1999).

O genoma de *Leptospira* consiste em dois cromossomos circulares de aproximadamente 4400 kb e 350 kb, respectivamente, e suas sequências foram recentemente estabelecidas (LEVETT, 2001). Apesar do sequenciamento de seis genomas até o presente momento, apenas 50% das 4768 sequências codificadoras (CDS) preditas foram identificadas como homólogas de outras espécies bacterianas (PICARDEAU *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2004<sup>a</sup>; NASCIMENTO *et al.*, 2004<sup>b</sup>). O genoma é grande quando comparado com outras espiroquetas como *Treponema spp* e

*Borrelia* spp, o que indica a habilidade de *Leptospira* de viver em ambientes diversos, como hospedeiros animais e o ambiente. Leptospiras contém duas cópias dos genes de RNA ribossomal 16S e 23S, mas somente uma cópia do gene 5S. Diversos elementos repetitivos têm sido descritos, tais como sequências de inserção, sequências espaçadoras e transposases, todos com papel em eventos de rearranjo genômico, mas todos estes elementos variam em número de cópias dependendo do sorovar (LEVETT, 2001). Evidências de transferência genética horizontal dentro do gênero através de sequências de inserção têm sido descritas (ZUERNER, 2004). Ferramentas para a manipulação genética têm sido recentemente desenvolvidas para estudos de patogênese, fatores de virulência e biologia celular do organismo (LOUVEL & PICARDEAU, 2007; CRODA *et al*, 2008).

### 1.1.2 Taxonomia

O gênero *Leptospira* pertence à Família Leptospiraceae, Ordem Spirochaetales, coexistindo duas formas de classificação, uma baseada em critérios genéticos e outra nos determinantes antigênicos. Ambas as classificações reconhecem espécies patogênicas e saprófitas. Dentro das diferentes espécies, encontram-se sorovares antigenicamente relacionados, que constituem os sorogrupos. Aproximadamente 260 sorovares já foram descritos, distribuídos em 29 sorogrupos (FAINE *et al.*, 1999). Isolados sorologicamente indistinguíveis podem pertencer a espécies totalmente diferentes, de acordo com a classificação genética (FERESU *et al.*, 1999; BRENNER *et al.*, 1999). A classificação genética das espécies do gênero *Leptospira* baseada em experimentos de hibridização DNA-DNA dividiu o gênero em 18 espécies, e esta classificação coexiste com a antiga classificação sorológica, na qual antisoros são utilizados para estabelecer relações antigênicas entre cepas baseadas na aglutinação cruzada de antígenos homólogos (BHARTI *et al.*, 2003 FAINE *et al.*, 1999). Esta classificação divide as leptospiras em sorogrupos, onde se encontram sorovares antigenicamente relacionados.

### 1.1.3 Patogênese

A patogênese da *Leptospira* ocorre a partir da penetração ativa através da pele lesionada ou intacta quando o hospedeiro permanece na água contaminada durante um período de tempo longo (BHARADWAJ, 2004). Após ter superado os mecanismos de defesa não-específicos, as leptospiros se multiplicam no sangue, na linfa, no fluido cérebro espinhal e em todos os tecidos, constituindo a fase aguda da doença que cursa com leptospiremia (FAINE *et al.*, 1999). Na lesão primária as leptospiros danificam as membranas das células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos pela ação dos fatores de virulência, ocorrendo o rompimento dos capilares e a migração das bactérias para os espaços extravasculares. As lesões preliminares são atribuídas à ação mecânica dos microrganismos dentro da parede dos vasos sanguíneos e são seguidas por hemorragias (BAROCCHI *et al.*, 2002). Provavelmente, os mecanismos de patogenicidade mais importantes sejam a adesão, a toxicidade e a motilidade. Os efeitos secundários da isquemia, anóxia e aumento da pressão nos tecidos, reforçam os danos e resultam na perda da função e morte celular (FAINE *et al.*, 1999). Contudo, o entendimento sobre o mecanismo de patogenicidade da leptospirose ainda é limitado. Os efeitos do patógeno no organismo podem ser determinados geneticamente de acordo com a resposta imune do hospedeiro, permanecendo assim indefinidos (LEVETT, 2001). A fase crônica da infecção é caracterizada pela presença de anticorpos e de leptospirúria (WHO, 2003). Neste momento a colonização renal é observada, principalmente dentro dos túbulos contorcidos proximais, onde os microrganismos podem sobreviver (FAINE *et al.*, 1999; BHARTI *et al.*, 2003).

Quanto aos mecanismos específicos de patogênese, a motilidade, a habilidade de se locomover em meio viscoso, parece ter um papel importante, pois está envolvida no processo de infecção inicial e disseminação do organismo a partir de seu sítio de entrada até os órgãos finais, como fígado, rins, pulmão e cérebro (BHARTI *et al.*, 2003). Outro fator que ilustra a importância da motilidade é a presença de 50 genes relacionados com a motilidade, dentre os 4768 genes preditos (PICARDEAU *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Associada com a motilidade, 12 proteínas de quimiotaxia também foram identificadas, as quais conferem vantagens na adaptação e migração pelos tecidos. Cepas virulentas de *Leptospira*

mostraram quimiotaxia por hemoglobina, enquanto que cepas avirulentas não demonstraram (YURI *et al.*, 1993). Além da habilidade de motilidade, *Leptospira* possui diversos supostos fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Hemolisinas, esfingomielinas, fosfolipases e proteínas de ligação à matriz extracelular têm sido descritas *in vitro*, mas sua relevância *in vivo* tem sido discutida, já que ferramentas para estudos genéticos destas proteínas estão recém sendo descritas (BERNHEIMER, 1986; DEL REAL *et al.*, 1986; SEGERS *et al.* 1990; LEE *et al.*, 2002).

#### **1.1.4 Apresentação clínica**

Na maioria dos casos de leptospirose humana os casos são benignos e autolimitantes (LEVETT, 2001). Frequentemente, as manifestações clínicas incluem: febre, dor de cabeça, frio, mialgia, dor abdominal e sufusão da conjuntiva (FARR, 1995), enquanto diarréias e vômitos podem aparecer em alguns casos (CICERONI *et al.*, 1995). Nas manifestações mais severas inclui falha renal, icterícia, hipotensão, meningite, hemorragia e/ou pneumonia hemorrágica que pode ser letal (VINETZ, 2001).

Outras doenças infecciosas que apresentam síndromes febris indiferenciadas, tais como a malária, dengue, influenza, febres virais hemorrágicas podem mimetizar a leptospirose. Em animais, infecções por *Leptospira* frequentemente causa falha renal e hepática (caninos), abortos, nascimento de fetos mortos, infertilidade (bovinos, suínos e eqüinos) uveíte (eqüinos), anemia hemolítica (ovinos e bovinos), e ocasionalmente morte (SMYTH *et al.* 1999).

#### **1.1.5 Epidemiologia**

A leptospirose é tida como uma das zoonoses mais difundidas no mundo. O agente infectante é transmitido de um mamífero infectado para outro através do contato direto ou indireto com urina que contenha leptospirosas viáveis, ou através de veículos inanimados, tais como solo, água ou utensílios contaminados. As taxas de incidência são mais significativas em países ou regiões de clima tropical do que em regiões de clima temperado (LEVETT, 1999; FAINE *et al.*, 1999; VINETZ, 2001; LEVETT, 2001; KATZ *et al.*, 2002; BHARTI *et al.*, 2003; BHARADWAJ, 2004; SEHGAL, 2006). Em países desenvolvidos a doença está comumente associada à prática de atividades

ocupacionais, recreacionais e esportes ao ar livre, como, por exemplo, natação, canoagem, *rafting*, ecoturismo e o triatlo. Já nos países em desenvolvimento, sua incidência é maior ocorrendo principalmente devido à falta de infra-estrutura de saneamento básico e pelo aumento desordenado da população e das habitações na periferia das grandes cidades, onde se encontram criadouros de roedores e focos de leptospirose (LEVETT, 2001). No Brasil, a leptospirose é uma zoonose muito importante, pois apresenta uma alta prevalência em várias regiões do país. No período de 2004 a 2006 foram notificados 39.494 casos de leptospirose no país, sendo que 10.341 foram confirmados e a taxa de letalidade foi de 11% (SINAN, 2007). A infecção humana se dá principalmente pelo contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, via contaminação do solo ou água. A prevalência de diferentes sorovares dentro de uma população humana depende dos reservatórios animais presentes e os sorovares que eles carregam, assim como as condições ambientais locais, ocupações e práticas agrícolas. Diversas associações sorovar-hospedeiro parecem ser ubíquas, por exemplo, a espécie *Rattus* e o sorovar Icterohaemorrhagiae, e camundongos e o sorovar Ballum. Além disso, uma única espécie pode carrear diferentes sorovares em distintas populações geograficamente distantes. A biodiversidade de *Leptospira* no ambiente é afetada pela geografia, clima, interações bióticas e atividades antropogênicas, exemplificada pela existência de poucos sorovares patogênicos em áreas urbanas e o número reduzido de reservatórios, principalmente cães e roedores, enquanto que em regiões tropicais, diversos mamíferos silvestres, tais como roedores quirópteros e marsupiais estão infectados por leptospirosas, e estas leptospirosas são mais diversificadas que em ambientes urbanos (BHARTI *et al.*, 2003; FAINE *et al.* 1999; LEVETT, 2001; SEHGAL, 2006).

### **1.1.6 Diagnóstico e Caracterização**

O diagnóstico laboratorial de leptospirose humana depende da fase evolutiva da doença e baseia-se na detecção do microrganismo em amostras clínicas ou em uma quadruplicação ou aumento no título de anticorpos no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). Porém, o isolamento do microrganismo em meio de cultura é demorado, assim o diagnóstico laboratorial da



leptospirose tem sido baseado principalmente em testes sorológicos. Embora o MAT seja recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico sorológico da leptospirose, apresenta uma série de problemas. Por um lado, o teste é complexo e requer a manutenção de grande número de sorovares em meio de cultura para garantir uma variedade antigênica dos diferentes sorogrupos de *Leptospira*. Por outro lado, apresenta reações cruzadas entre diferentes sorovares e baixa sensibilidade na fase inicial da doença, já que os níveis de anticorpos somente são detectáveis 6-7 dias após aparecerem os sintomas. Outros testes sorológicos têm sido avaliados. Anticorpos do tipo IgM têm sido detectados por ELISA em líquido céfalo-raquidiano de pacientes com leptospirose icterica (CAMARGO *et al.*, 1995), Dot-ELISA para detecção de anticorpos IgM em saliva (SILVA *et al.*, 1997) e um teste comercial IgM dot-ELISA “*dipstick*” (AHMAD *et al.*, 2005; VIJAYACHARI & SEHGAL, 2006). O diagnóstico molecular tem tido uma atenção maior nos últimos anos. O DNA de *Leptospira* tem sido detectado em materiais clínicos por *Dot-blotting*, hibridização *in vitro* e técnicas derivadas de PCR. A técnica de PCR e suas variantes têm demonstrado ser a mais promissora, devido à facilidade na obtenção de DNA de *Leptospira* em quaisquer fluidos biológicos, sua sensibilidade em comparação a outras técnicas e a utilização em pacientes que já iniciaram um tratamento com antibióticos, distinguindo-se assim das técnicas sorológicas, que necessitam a presença de anticorpos, tornando possível a detecção da doença em seus estágios iniciais. (CHU *et al.*, 1998; HEINEMANN *et al.*, 2000; VINETZ, 2001; WILSON *et al.*, 2002).

Devido às dificuldades associadas com a identificação sorológica de isolados de *Leptospira*, têm aumentado o interesse em métodos moleculares na identificação e subtipagem de isolados. Métodos utilizados incluem digestão do DNA cromossomal por endonucleases de restrição (REA) (BROWN & LEVETT, 1997), análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) (PEROLAT *et al.* 1993; KAWABATA *et al.*, 2001), ribotipagem (PEROLAT *et al.*, 1994), eletroforese em campo pulsado (PFGE) (HERMANN *et al.*, 1992), e técnicas baseadas em PCR, tais como, AP-PCR, LSSP-PCR, VNTR, REA-PCR, sondas específicas e Real-Time PCR (MAJED *et al.*, 2005; PEROLAT *et al.*, 1994; BROWN & LEVETT, 1997; GRAVEKAMP *et al.*, 1993; SMYTHE *et al.*, 2002; LEVETT *et al.*, 2005). Diversas abordagens mencionadas acima permitem

a diferenciação de espécies e/ou sorovares, entretanto, RFLP, PFGE e ribotipagem são métodos complexos, que requerem tempo e grandes quantidades de DNA, enquanto que métodos como AP-PCR e LSSP-PCR resultam em complexos padrões de bandas, dificultando assim a troca de dados entre laboratórios (BHARTI *et al.*, 2003).

A identificação de cepas de *Leptospira* é tão importante quanto o entendimento dos mecanismos de patogênese, que, embora não estejam totalmente desvendados, garantem a promessa de que, em um futuro próximo, as técnicas de biologia molecular para leptospirose possam esclarecer todos esses mecanismos (LEVETT, 2001; AHMAD *et al.*, 2005; VIJAYACHARI & SEHGAL, 2006).

### **1.1.7 Tratamento e Prevenção**

O antibiótico recomendado para prevenção da leptospirose é a doxicilina, em dose única semanal de 200 mg durante o período de exposição. Já para o tratamento, dá-se preferência à penicilina cristalina na dose diária de 2.000.000 UI, a cada seis horas, via intravenosa por sete dias. A dose diária recomendada (FAINE *et al.*, 1999) de doxicilina para tratamento da leptospirose é de 200 mg, por sete dias, sendo que seus efeitos colaterais mais comuns são sintomas gastrointestinais. Outras drogas alternativas referidas são ampicilina, amoxicilina e tetraciclina, utilizadas por sete a dez dias. Não há antibiótico capaz de prevenir o dano causado em tecidos e órgãos, mas parecem atuar benéficamente na supressão da leptospirúria, redução da duração e gravidade dos sintomas e até mesmo na redução da mortalidade (FAINE *et al.*, 1999). Na prática clínica, acredita-se que a terapia com antibióticos é mais efetiva se iniciada precocemente no curso da doença (FAINE *et al.*, 1999).

Além dos antibióticos, outras medidas de prevenção podem ser tomadas (SEHGAL, 2006). Nos países em desenvolvimento, o controle da doença depende de medidas higiênico-sanitárias básicas e eficientes. No entanto, até o presente momento poucas medidas efetivas para prevenção da doença têm sido implantadas (McBRIDE *et al.*, 2005).

### 1.1.8 Vacinas

Atualmente não existe uma vacina contra a leptospirose humana recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Porém, vários estudos têm sido realizados para avaliar o potencial imunogênico de vacinas (MARTINEZ *et al.*, 2000; IKOEV *et al.*, 1999; ZHUO & WAN, 1995; KOIZUMI & WATANABE, 2005; THONGBOONKERD, 2008).

As vacinas veterinárias contra a leptospirose disponíveis no mercado são as chamadas bacterinas, que conferem imunidade pouco duradoura e são sorovar-específicas. Além da necessidade de repetição da dose vacinal para manter a imunidade, o fato de ser produzida apenas com um sorovar ou um conjunto restrito de sorovares limita a proteção dos animais quando aplicada, já que as espécies de leptospiros incluem cerca de 250 sorovares patogênicos (GAMBERINI *et al.*, 2005).

### 1.1.9 Conclusão

A leptospirose continua sendo considerada mundialmente como um grande problema de saúde pública. Além das apresentações clínicas altamente variáveis e não específicas, o diagnóstico e a caracterização são difíceis e requerem um alto grau de suspeita aliado à potencial exposição ambiental. Métodos mais eficientes, rápidos e efetivos precisam ser desenvolvidos para um diagnóstico clínico rápido e para uma quantificação do risco ambiental. Métodos baseados na detecção e identificação de DNA leptospiral evitam os problemas inerentes ao isolamento deste organismo fastidioso, e podem ser úteis para o monitoramento do risco de contaminação com este patógeno. Estes estudos moleculares necessitam ser validados e padronizados em diferentes regiões do mundo onde a leptospirose é comum. Estes estudos devem ser comunicados aos Ministérios da Saúde e agências de controle de doenças como uma justificativa de campanhas de saúde para o controle da Leptospirose.

## 2. Objetivo

### 2.1 Geral

O objetivo geral do estudo foi adaptar um método de caracterização baseado em PCR, caracterizando isolados de *Leptospira interrogans* por análise de VNTR (Repetições de Número Variável em Tandem) e detecção por gel de agarose e eletroforese capilar.

### 2.2 Específicos

- Amplificação por PCR dos VNTR's de 42 isolados de *L. interrogans*;
- Detecção e cálculo das VNTRs por eletroforese em gel de agarose;
- Escolha do menor set de primers suficientes para a caracterização de todas amostras;
- Eletroforese capilar com os primers selecionados e medição das VNTR's;
- Comparação dos resultados das duas técnicas.

### 3. Artigo

#### **Tipificação de isolados de *Leptospira interrogans* através de VNTR e detecção por eletroforese capilar**

**M. Q. Fagundes, F. K. Seixas, O. A. Dellagostin**

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

#### **Resumo**

A leptospirose é zoonose de ampla distribuição mundial, endêmica de áreas tropicais. A espécie *Leptospira interrogans* é a mais encontrada em infecções humanas mundialmente, mas outras espécies como *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* também estão associadas com a leptospirose humana. Investigações epidemiológicas de leptospirose encontram problemas devido à complexa e lenta caracterização sorológica. Diversos métodos para a tipagem molecular de *L. interrogans* existem, um dos quais é análise do número variável de repetições em tandem (VNTR). Este método é baseado na separação e quantificação do tamanho de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose. No presente trabalho, o VNTR existente de *Leptospira interrogans* é adaptado à eletroforese capilar. Os ensaios foram analisados em gel de agarose e eletroforese capilar em um painel de isolados de *Leptospira* de diferentes espécies animais. Os resultados da análise por eletroforese capilar mostraram-se equivalentes, e em alguns casos mais sensíveis que a análise através do gel de agarose. O ensaio aqui apresentado permitiu uma caracterização rápida, automatizada e precisa de isolados de *L. interrogans* e representa um aperfeiçoamento sobre o atual método de análise baseado em gel de agarose.

Palavras-chave: *Leptospira*; Leptospirose; Genotipagem; Eletroforese capilar; número variável de repetições em tandem; VNTR

## **Strain typing of *Leptospira interrogans* through VNTR and detection by capillary electrophoresis**

**M. Q. Fagundes, F. K. Seixas, O. A. Dellagostin.**

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

### **Abstract**

Leptospirosis is a worldwide distributed zoonosis, endemic in tropical areas. The bacteria *Leptospira interrogans* is the most common species encountered in human infections around the world, but other pathogenic species such as *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii* are also associated with human leptospirosis. Epidemiologic investigations of leptospirosis still rely on complex and slow serological identification tests. Several methods for molecular typing of *L. interrogans* exist, one of which is the variable-number of tandem repeats analysis (VNTR). This method is based on separating and sizing amplified VNTR-PCR products by agarose gel electrophoresis. In the present work, the existing *L. interrogans* assay is adapted to capillary electrophoresis. The assay was analyzed by agarose gel electrophoresis and capillary electrophoresis and tested on a panel of *L. interrogans* strains from different animal species. The results from the capillary electrophoresis-based assay are shown to be equivalent to, and in a few cases more sensitive than, the gel-based genotyping assay. The assay presented here allows for a swift, automated and precise typing of *L. interrogans* isolates and represents an improvement over the current gel-based method.

Keywords: *Leptospira*; Leptospirosis; Genotyping; Capillary electrophoresis; variable number of tandem repeats; VNTR.

## 1. Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa zoonótica que é transmitida para animais e humanos primariamente via água (FAINE *et al.*, 1999). O agente etiológico é uma espiroqueta que coloniza os túbulos renais de animais infectados e é excretada no ambiente através da urina por períodos de tempo variáveis. Um total de 19 espécies de *Leptospira* e mais de 200 sorovares têm sido descritos (LEVETT, 2001). Todas as espécies de *Leptospira* são bem adaptadas para a vida na água, inclusive algumas espécies como *L. biflexa*, são saprófitas exclusivamente aquáticos. Em regiões tropicais, a leptospirose é um grave problema de saúde pública, amplamente distribuída mundialmente (BHARTI *et al.*, 2003). A doença é endêmica nestas regiões, onde o saneamento básico não é adequado ou práticas agrícolas levam à contaminação da água através da urina animal. Enquanto que a maioria das infecções por *Leptospira* são auto-limitantes, complicações são comuns, envolvendo falha renal, hemorragia pulmonar e morte em 10-50% dos casos severos (MACBRIDE *et al.*, 2005).

A tipagem tradicional do agente da leptospirose é baseada na identificação sorológica dos sorovares circulantes. Os sorogrupos são identificados utilizando o teste de microaglutinação (MAT) e PFGE, e os sorovares são identificados através do teste de aglutinação de adsorção cruzada. Estes métodos são complexos, porque necessitam a manutenção de coleções de culturas de cepas para a utilização como antígeno e também requerem estruturas laboratoriais que não são usualmente encontradas em regiões nas quais a incidência da doença é alta. Além disso, a interpretação dos resultados é complexa pelas frequentes reações cruzadas que ocorrem entre os sorogrupos (LEVETT, 2001). Em virtude disto, a classificação genotípica está substituindo a classificação sorológica. Entretanto, apesar da classificação sorológica não ter nenhum significado taxonômico, a identificação do sorogrupo ou sorovar infectante é útil para a identificação dos reservatórios e para o desenvolvimento de estratégias preventivas (MACBRIDE *et al.*, 2005). Em função desta

importância histórica e prática, as duas classificações co-existem, e sorovares podem ser identificados por diferentes métodos moleculares, como RFLP (PEROLAT *et al.*, 1993; THIERMANN *et al.*, 1985), RAPD (RALPH *et al.*, 1993) e PFGE (HERRMANN *et al.*, 1992). Entretanto, todos estes métodos moleculares possuem certos problemas, como necessidade de altas concentrações de DNA ou podem não ser sempre suficientemente discriminatórios e reprodutíveis.

Recentemente, outros métodos moleculares têm sido propostos, como a tipagem pelo sequenciamento de múltiplos loci (MLST) (AHMED *et al.*, 2006) e a análise do número variável de repetições em tandem (VNTR), as quais são amplamente utilizados na caracterização de outras espécies bacterianas patogênicas (LINDSTEDT *et al.*, 2005). O MLST tem uma utilidade maior na caracterização de espécies, enquanto o VNTR na identificação de sorovares e cepas. Na técnica de VNTR, a discriminação de cepas é baseada nas diferenças no número e tamanho destas VNTRs, que são minissatélites utilizados como marcadores que variam em tamanho da unidade repetitiva (7 a 125 pb) e no número de repetições (1 a 32). Os produtos de PCR obtidos variam em tamanhos de 150 a 1000 pb. A técnica originalmente descrita é baseada na separação eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose, na determinação dos tamanhos dos produtos através de *softwares* de imagem ou a olho nu, e o número de repetições é baseado nos tamanhos estimados deste loci (POURCEL *et al.*, 2007). Além disto, é uma técnica que necessita de quantidades pequenas de DNA, utiliza uma metodologia de PCR e é de simples execução. Outra abordagem para determinar o tamanho dos produtos de PCR é a eletroforese capilar (VAN BELKUM, 2007). A eletroforese capilar possui diversas vantagens. Primeiramente, utilizando placas de 96 cavidades, um número grande de amostras pode ser processado, possibilitando a análise em larga escala. Segundo, cada amostra contém seu próprio marcador, permitindo uma determinação mais precisa do produto de PCR e eliminando distorções que ocorrem durante a eletroforese em gel de agarose. Terceiro, permite a resolução de até 1 par de base, uma capacidade alta de resolução que permite a discriminação de fragmentos não separáveis com a eletroforese em gel de agarose (LISTA *et al.*, 2006). Além destas vantagens, utilizando diferentes marcadores fluorescentes, é possível fazer a multiplexagem da reação de PCR para a análise no mesmo capilar,



reduzindo ainda mais o tempo e o custo. O carregamento da amostra, a separação e a determinação do tamanho são automatizados. Softwares específicos têm sido desenvolvidos para interpretação dos dados gerados. A alta acurácia, o grande poder de resolução e o tempo reduzido fazem da eletroforese capilar uma excelente escolha para o VNTR (NEDERBRAGT *et al.* 2008).

O propósito do presente trabalho foi adaptar o VNTR proposto por Majed *et al.* para caracterizar isolados de *L. interrogans* a partir de amostras de animais silvestres, urbanos e humanos isoladas no Brasil à análise de eletroforese capilar.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Isolados

Os 42 isolados de *L. interrogans* utilizados neste estudo (Tabela 3) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Silvio Arruda Vasconcelos (Universidade de São Paulo), obtidos nos últimos 20 anos a partir de amostras animais e humanas. Estes foram cultivados em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecidos com 10% EMJH suplemento (Difco Laboratories), por 7-10 dias sob condições aeróbicas a 28°C. As culturas estoque foram mantidas em meio semi-sólido e estocadas com 10% glicerol a -70°C.

### 2.2 Extração do DNA genômico

A extração foi feita baseada no protocolo adaptado do kit Bacterial Genomic DNA extraction (GE Healthcare) Um total de 30 mL de cultura de *L. interrogans* foi centrifugado à 14,000 rpm por 20 min à 4°C. Este *pellet* foi ressuscitado em 80 µL de PK Buffer (12 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 mM EDTA, 0,6% SDS) e foi adicionado 20 µL de proteinase K (20 mg/mL), agitado em vórtex e incubado por 15 min à 55°C. Após, foi adicionado 7 µL de RNase, incubado por 15 min à temperatura ambiente, seguido da adição de 500 µL de solução de extração, agitado em vórtex novamente e incubado por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi transferida para a coluna de cromatografia, centrifugada a 8000 rpm por 1 min, e foi adicionado 500 µL de Wash Buffer para uma nova centrifugação à 12,000 rpm por 3 min. Após, a eluição foi feita adicionando-se 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA 100 mM) 1x pré-aquecido à 50°C, centrifugado por 12,000 rpm por 3 min, para obtenção do DNA genômico purificado.

### 2.3 Análise de MLVA

Os *loci* VNTR utilizados neste trabalho foram previamente descritos (MAJED *et al*, 2004), e estão descritos na Tabela 1.

**TABELA 1:** *Primers dos loci VNTR de L. interrogans.*

Lócus VNTR	Primers 5' $\rightarrow$ 3'	Tamanho da unidade	Nº de cópias em <i>L. interrogans</i>	Tamanho do produto de PCR amplificado (pb)
VNTR4	4a (CAAATCAGTCACTACCCTG) 4b (CTTTGTTGGAGCGCAATCTC)	34	5	362
VNTR7	7a (TCATCTGCTCCGGAGATTCG) 7b (TCCCTCCACAGGTTGTCTTG)	46	3	304
VNTR9	9a (TCGCTCTACAGGTCGGTGTT) 9b (GGTGAAGAGCAAACCTTTGG)	46	4	381
VNTR10	10a (TCCAAAATTCAGCCCTCAAG) 10b (GACGCTTGGCATTGTATCC)	45	2	239
VNTR11	11a (ACAGAAGCCGTCTCATTTTG) 11b (CACAGGTCGGAATTTGTCA)	45	4	293
VNTR19	19a (CAGAAACAAGAGGGAAGATTC) 19b (ACTCTCATTTAAGAGTGGCTG)	47	6	421
VNTR23	23a (TTTCCAAATATACTTACTCGG) 23b (GCAAGAGAATTATTGGGATGG)	46	5	339

Com a finalidade de amplificar os *loci* VNTR, foi realizada PCR utilizando a enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf), sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação à 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 s, anelamento à 55°C por 30 s e extensão à 72°C por 1 min, e um ciclo final de extensão à 72°C por 10 min.

Os componentes da reação de PCR foram combinados como descrito na Tabela 2, com volume final de 25  $\mu$ L. Como controle negativo foi realizada uma reação de PCR similar, porém o DNA foi substituído por água milli-Q.

**TABELA 2.** Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 µl
dNTP's (10mM)	1,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
Tampão da enzima 1X	2,5 µl
<i>Primers</i> (300 ng/µl)	1 µl de cada
DNA molde	1,0 µl
Água milli-Q	17,55 µl

Um volume de 15 µl do produto da PCR foi utilizado para análise por eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi realizada durante uma hora sob 80 V, em géis de agarose 2% contendo 0,5 µg de brometo de etídeo, em um tampão TBE 1x (90 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA pH 8,0). O tamanho dos alelos foi estimado utilizando 100 *bp* DNA *plus Ladder* (Invitrogen) e 50 *bp Ladder* (Invitrogen) como marcadores de tamanho molecular. Os géis foram visualizados em um transluminador ultravioleta.

## 2.4 Eletroforese capilar

Para a eletroforese capilar, foi realizada uma reação de PCR, somente com os *primers* VNTR7, VNTR10 e VNTR19, que foram igualmente discriminatórios em relação a todo o *set* de *primers*, em um volume final de 25 µL, com 8 pmol do *primer* R e do *primer* M13(-21) (SCHUELKE, 2000) marcado com o fluoróforo HEX (hexachloro-6-carboxy-fluorescine) e 2 pmol de cada *primer* F, 50 ng de DNA genômico, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10x. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94 °C, 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), anelamento (56 °C, 45 s) e extensão (72 °C, 45 s), seguidos por 8 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s e 72 °C por 45 s e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min (SCHUELKE, 2000). Após, foi feita uma mistura em microplacas de 96 cavidades de 2 µL da reação de PCR diluída 1:10, 0,25 µL do marcador molecular ET-ROX 900 (GE Healthcare), 7,75 µL de Tween

20 0,1%, e a placa foi colocada no termociclador para uma etapa de incubação à 95° C por 5 min e imediatamente após foi levada ao gelo para uma incubação de 1 min. Em seguida, esta placa foi submetido à eletroforese capilar em um seqüenciador MegaBACE 500 (Amershan Biosciences), sob as seguintes condições: 45 s de tempo de injeção, 3 kV de voltagem de injeção, 120 min de tempo de corrida e 10 kV de voltagem de corrida.

Os resultados foram analisados no software MegaBACE Genetic Profiler (Amershan Biosciences).

### 3. Resultados

#### 3.1 Análise de MLVA por eletroforese em gel de agarose

A diversidade genética de uma coleção de 42 isolados de *L. interrogans* de origem animal e humana, independentemente obtidas de diversas localidades durante os últimos 20 anos foi analisada (Tabela 3). A maioria das amostras foram isolados de caninos, no entanto foram analisadas cepas isoladas de humanos e outras espécies como suínos e bovinos também foram encontradas. O cálculo do número de repetições foi baseado no método descrito por Majed (2004), onde o número de repetições é determinado pelo tamanho da massa molecular do produto de PCR quando comparado com um marcador molecular de massa conhecida para cada um dos *locus* VNTR. Os isolados 5, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44 e 45 apresentam o mesmo perfil de VNTR com todos os *primers* VNTR4, VNTR7, VNTR10, VNTR11, VNTR19 e VNTR23 (Figura 1 e Tabela 3). Estes isolados são de 2004, com exceção do isolado 35 que é do ano de 2002 e do isolado 5 que é do ano de 1987. Todos foram isolados pela VPS/FMVZ/USP. Assim, tipificamos estes isolados através do perfil de VNTR como sendo do sorovar Pomona genótipo A (PAVAN *et al.*, 2008). Já o isolado 39 é uma amostra do ano de 1986. Esta apresenta o perfil idêntico ao de Pomona Kennewcki da bateria da OMS. Os *primers* VNTR4, VNTR7, VNTR10 e VNTR23 foram os mais discriminatórios, enquanto que o *primer* VNTR11 foi o com o menor poder de discriminação. No entanto, quando analisados em conjunto, a combinação dos *primers* VNTR7, VNTR10 e VNTR19 foi o suficiente para a caracterização de todas as amostras estudadas à nível de sorovar. Dentre os sorovares encontrados no total de isolados, como mostra a Tabela 1, 19 pertenciam ao sorovar Canicola (46%), 14 ao sorovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (33%), 8 ao sorovar Pomona (19%) e 1 ao sorovar Kennewcki (2 %). Já dentre as espécies de origem dos isolados, os suínos foram os que apresentaram uma maior diversidade de sorovares circulantes, sendo a maioria do sorovar Pomona, mas também foram encontrados os sorovares Canicola, Kennewicki e Icterohaemorrhagiae.

**TABELA 3.** Cepas de leptospiros isoladas no Brasil segundo espécie animal de origem e resultado do procedimento de tipificação por VNTR.

Nº ordem	Origem do isolado	VNTR4	VNTR7	VNTR9	VNTR10	VNTR11	VNTR19	VNTR23	Tipificação VNTR (sorovar)
1	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (Genotype A)
2	Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
3	Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
4	Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
5	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
6	Rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
7	Rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
8	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
9	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
10	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
11	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
12	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
13	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
14	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
15	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
16	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
17	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
18	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
19	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
20	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
21	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
22	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
23	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
24	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	5	0	6	10	2	8	3	Kennewcki
25	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae
26	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)

27	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
28	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
29	Suíno ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genotype A)
30	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
31	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
32	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
33	Canino ( <i>Caninus familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
34	Caprino ( <i>Capra aegagrus</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
35	Caprino ( <i>Capra aegagrus</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
36	Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
37	Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	1	10	2	3	2	10	2	Canicola
38	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
39	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
40	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
41	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni
42	Rato ( <i>Ratus norvegicus</i> )	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni

Os caninos em sua maioria possuíam o sorovar Canicola, mas duas amostras eram do sorovar Icterohaemorrhagiae. Já os isolados de humanos e ratos apresentaram o mesmo sorovar circulante em todas as amostras, apesar de não conseguirmos diferenciar o sorovar Icterohaemorrhagiae do sorovar Copenhageni. Finalmente, os dois isolados de caprinos pertenciam ao sorovar Canicola, e os dois isolados bovinos aos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae.





M- 50pb

1- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (5 cópias)  
 2- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (2 cópias)  
 3- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (5 cópias)  
 4- Isolado de *Sus scrofa domestica* ( 4 cópias\*)

VNTR 4

5- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (1 cópia)  
 6- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (0 cópia)  
 7- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (0 cópia)  
 8- Isolado de *Sus scrofa domestica* ( 1 cópia)

VNTR 7

9- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (1 cópia)  
 10- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (7 cópias)  
 11- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (6 cópias)  
 12- Isolado de *Sus scrofa domestica* (6 cópias)

VNTR 9

13- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (13 cópias)  
 14- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (14 cópias)  
 15- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (10 cópias)  
 16- Isolado de *Sus scrofa domestica* (10 cópias)

VNTR10

17- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (8 cópias)  
 18- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (8 cópias)  
 19- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (8 cópias)  
 20- Isolado de *Sus scrofa domestica* (8 cópias)

VNTR 19

21- *Leptospira interrogans* Djasiman djasiman djasiman\* (2 cópias)  
 22- *Leptospira interrogans* Pomona pomona Pomona (1 cópia)  
 23- *Leptospira interrogans* Pomona kennewiki LT 1026 (3 cópias)  
 24- Isolado de *Sus scrofa domestica* ( 2 cópias)

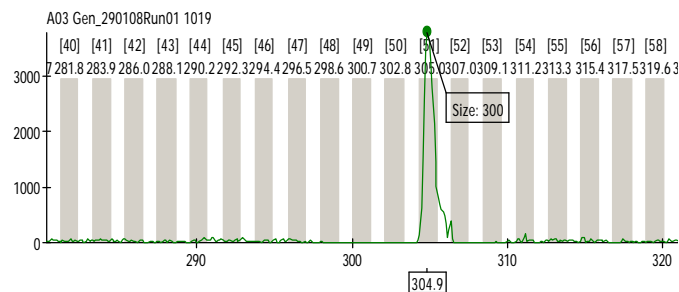
VNTR 23

**Figura 1:** Análise por PCR do polimorfismo dos *locus* VNTR. \* Amostra de referência da OMS. \* O primer VNTR11 também foi utilizado, mas não está mostrado.

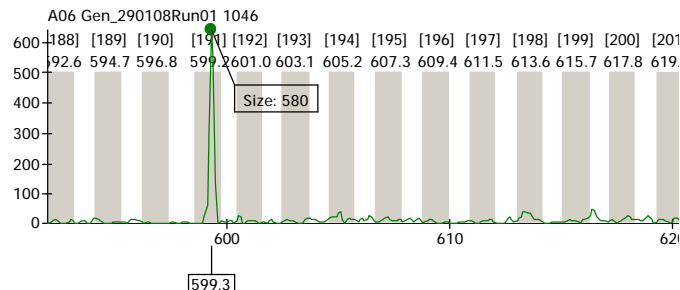
### 3.2 Análise de MLVA por eletroforese capilar

Os três *primers* VNTR (VNTR7, VNTR10 e VNTR19) que foram capazes de diferenciar os isolados de *L. interrogans*, e geraram produtos de PCR marcados que foram separados por eletroforese capilar no sequenciador MegaBACE 500 e os eletroferogramas foram analisados pelo software MegaBACE Genetic Profiler para a determinação do tamanho exato dos fragmentos, utilizando como referência o marcador de massa molecular ET-ROX 900. Neste estudo, os 42 isolados de *L. interrogans*, obtidos a partir de amostras clínicas de humanos, suínos, caninos, bovinos e ratos, puderam ser adequadamente caracterizados em nível de sorovar, e os dados gerados estiveram de acordo com os dados gerados através da eletroforese em gel de agarose (Fig. 2).

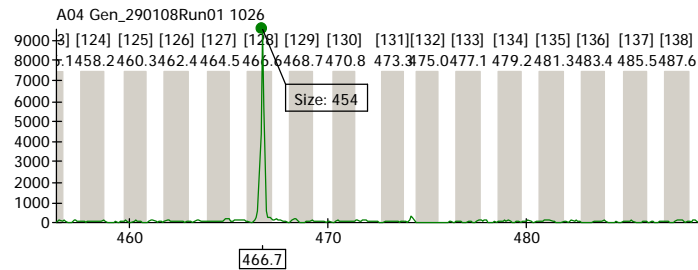
#### VNTR 7



#### VNTR 10



## VNTR 19



**Figura 2:** Eletroferogramas representativos gerados pela separação dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar. Os alelos de *L. interrogans* estão mostrados em verde, com o pico demonstrando o tamanho do amplicon em pares de base.

Entretanto, assim como no gel de agarose, a eletroforese capilar não foi capaz de diferenciar os isolados 6, 9, 11, 12, 25, 46, 48, 50, 57, 58, 59, 60 e 63, nas quais o perfil encontrado não pode ser determinado se pertence ao sorovar Icterohaemorrhagiae ou ao sorovar Copenhageni, um resultado esperado, já que nenhuma técnica molecular descrita até o momento para *Leptospira* conseguiu diferenciar. A técnica de VNTR analisada através de eletroforese capilar foi aplicada a *L. interrogans*, e capaz de identificar os isolados com um poder de discriminação igual ou superior à eletroforese em gel de agarose. Além disso, o VNTR é uma técnica simples e rápida de ser realizada, que quando analisada por eletroforese capilar, mostrou que aumenta ainda mais seu poder discriminatório, sua rapidez e diminui seu custo, já que a eletroforese capilar revelou o tamanho exato dos *amplicons*, e permitindo calcular com exatidão o número de repetições de cada VNTR, sem a necessidade de aproximações decimais devido à análise dos géis de agarose.

#### 4. Discussão

A leptospirose é uma zoonose frequente no Brasil apesar do clima tropical seguido de períodos de chuvas intensas (ROMERO *et al*, 2003). Devido à associação de certos sorogrupos e sorovares com manifestações severas e complicações da doença, um método que pudesse caracterizar rapidamente e facilmente os sorovares durante um surto é necessário. Há poucas informações disponíveis sobre o *status* de isolados de leptospirose no Brasil. Dentre os isolados de *Leptospira* spp., *L. interrogans* é com certeza a espécie de maior importância, representando mais de 90% das espécies encontradas no Brasil, e dentre os isolados conhecidos, 77,78% pertencem ao sorovar Copenhageni, 11,11% ao sorovar Canicola e 5,55% ao sorovar Pomona (SAKATA *et al*, 1992). Desde então, diversos isolados têm sido obtidos e esforços para a caracterização destes têm sido feitos.

A tradicional caracterização sorológica de isolados de *Leptospira* é um processo difícil e complexo, que envolvem testes de aglutinação de adsorção cruzada e requer uma grande coleção de antisoros. O desenvolvimento de um método preciso e rápido é essencial para a caracterização de amostras clínicas e diagnósticos médicos, assim como tratamentos e o controle da doença. Métodos de tipagem molecular têm sido descritos para *Leptospira*, incluindo RAPD (RAMADASS, 1997), PFGE (HERRMANN, 1992), AP-PCR (ROY, 2004) e FAFLP (VIJAYACHARI, 2006). Cada um destes métodos tem suas desvantagens, como poder discriminatório insuficiente, baixa reprodutibilidade entre laboratórios e dificuldades com os bancos de dados e disseminação de dados (RAMISSE, 2004), além de requerem equipamentos especializados. A análise do número variável de repetições em tandem (VNTR) tem provado ser um método altamente discriminatório para o estudo da estrutura populacional bacteriana e para a caracterização de isolados de *L. interrogans*, a espécie patogênica de maior importância em saúde pública.

O método foi aplicado a uma coleção de isolados de *L. interrogans* nos últimos 20 anos de diversas espécies animais e humanas. Os genótipos encontrados através do gel de agarose corresponderam exatamente aos genótipos encontrados na eletroforese capilar. Quando comparados com a literatura, nossos resultados mostram que o sorovar Icterohaemorrhagiae é o sorovar mais prevalente dentre as populações de leptospiros isoladas de ratos e humanos no Brasil (ROMERO, YASUDA, 2006; PEREIRA *et al*, 2000; DE FARIA *et al*, 2008), diferente da situação da Argentina, onde Pavan e colaboradores (2008) mostraram que o sorovar Pomona é um dos principais sorovares circulantes naquele país, sendo identificado em diversas outras espécies. No caso de caprinos, somente o sorovar Canicola foi encontrado, em contraste com outros trabalhos, onde outros diversos outros sorovares foram descritos (LILENBAUM *et al*, 2008).

A análise de repetições multi-lócus de número variável permite uma genotipagem rápida, fácil e altamente específica para caracterização de microorganismos patogênicos (LINDSTEDT *et al*, 2005; VAN BELKUM *et al*, 2007). A determinação de *amplicons* utilizando eletroforese em gel agarose é um método rápido e fácil, entretanto, a comparação de fragmentos entre diferentes géis é complexa. Além disso, a determinação do tamanho dos fragmentos sofre com baixa resolução dos géis. Uma alternativa é a eletroforese capilar para determinação do tamanho dos fragmentos. A determinação dos fragmentos utilizando eletroforese capilar aumenta em sensibilidade, número de amostras processadas, resolução e diminui o tempo de análise dos resultados. No presente trabalho, um método previamente descrito de VNTR para *L. interrogans* (MAJED *et al*, 2004) foi adaptado para a eletroforese capilar.

## 5. Conclusão

Nossos resultados indicaram que a eletroforese capilar é um método adequado para análise de dados derivados de VNTR para *L. interrogans*. Outras estratégias poderiam ser adotadas neste método para um aumento da praticidade e significância na caracterização de isolados de *L. interrogans*. Uma delas é a multiplexação dos *primers* VNTR, com diferentes marcadores fluorescentes, permitindo assim o racionamento do número de reações de PCR necessárias para o VNTR e também a economia de custos em termos de reagentes e tempo de trabalho. Outra seria a análise filogenética destes isolados, para o estabelecimento de relações filogenéticas e epidemiológicas com outros sorovares de *Leptospira* encontrados no Brasil e na América do Sul. Estas estratégias já estão sendo adotadas.

## 6. Referências

AHMAD, S. N.; SHAH, S.; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduated Medicine**. v. 51, p. 195-200, 2008.

AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M. L.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 23, p. 5-28, 2006.

BERNHEIMER, A. W.; BEY, R. F. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. **Infection and Immunity**. v. 54, p. 262-64, 1986.

BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6926-6932, 2002.

BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease? **Indian Journal of Medical Research**. v. 120, p. 136-138, 2004.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZJ. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**. v. 3, p. 757-771, 2003.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49, p.839-858, 1999.

BROWN, P. D. & LEVETT, P. N. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. **Journal of Medical Microbiology**. v. 46, p. 173-181, 1997.

CAMARGO, E. D.; SILVA, M. V.; VAZ, A. J.; BATISTA, L.; BRANDÃO, A. P.; FERREIRA, A. W.; ROMERO, E. C.; BARBOSA, P. R. S. ELISA-IgM applied to cerebrospinal fluid in human leptospirosis. **Serodiagnosis, Immunotherapy and Infectious Disease**. v. 7, p. 19-22, 1995.

CHU, K. M.; RATHINAM, R.; NAMPERUMALSAMY, P.; DEAN, D. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. **Journal of Infectious Diseases**. v.177, p.1314- 1321, 1998.

CICERONI, L.; PINTO, A.; BENEDETTI, E.; PIZZOCARO, P.; LUPIDI, R.; CINCO, M.; GELOSA, L.; GRILLO, R.; RONDINELLA, V.; MARCUCCIO, L. Human leptospirosis in Italy, 1986-1993. **European Journal of Epidemiology**. v. 11, p. 707-10, 1995.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A.; SANTOS, C. S.; REIS, M.G.; KO, A.; PICARDEAU, M. Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira*: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. **Infection and Immunity**. v. 93, p. 356-365, 2008.

DE FARIA, M. T.; CALDERWOOD, M. S.; ATHANAZIO, D. A.; MCBRIDE, A. J. A.; HARSTKEERLD, R. A.; PEREIRA, M. M.; KO, A. I.; REIS, M. G. Carriage of *Leptospira*



*interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**. v. 108, p. 1-5, 2008.

DEL REAL, G.; SEGERS, R. P.; VAN DER ZEIJST, B. A.; GAASTRA, W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Infection and Immunity**. v. 57, p. 2588-90, 1989.

ELLIS, W. A.; HOVIND-HOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCH-ANDRESSEN, A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Zentralbli Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene**. v. 255, p. 323-35, 1983.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne, Australia. 1999, p. 255.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical Infection Diseases**. v. 2, p. 1-6, 1995.

FERESU, S. B.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. **International Journal of Systematic and Bacteriology**. v. 49, p. 1111-7, 1999.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**. v. 244, p. 305-313, 2005.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KAMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J.; EVERARD, C. O.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **Journal of Genetics and Microbiology**. v. 139, p. 1691–1700, 1993.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.261-267, 2000.

HERMANN, J. L.; BELLEGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 1265–1276, 1992.

IKOEV, V. N.; GORBUNOV, M. A.; VACHAEV, B. F.; IAGOVKIN, E. A.; KONDRATENKO, V. F.; ANAN'INA, I.; ANSIMOVA, T. I.; KOSTINA, N. I.; IUR'EVA, I. L.; NIKITIN, M. G. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii**. P. 39-43, 1999.

KATZ, A. R.; ANSDELL, V. E.; EFFLER, P. V.; MIDDLETON, C. R.; SASAKI, D. M. Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 66, p. 61-70, 2002.

KAWABATA, H., DANCEL, L. A.; VILLANUEVA, S.; YANAGIHARA, Y.; KOIZUMI, N.; WATANABE, H. flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. **Microbiology and Immunology**. v. 45, p. 491–496, 2001.

KOIZUMI, N.; WATANABE H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **Journal of Postgraduate Medicine**. v. 51, p. 210-4, 2005.

LEE, S. H.; KIM, S.; PARK, S. C.; KIM, M. J. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 315-22, 2002.

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

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

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; TURNER, D. E.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, p. 45-49, 2005.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO F. Z.; CORTEZ A.; SOUZA S. O.; BRANDÃO P. E.; VASCOCELLO S. A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology** v. 69, p. 837-84, 2008.

LIN, M.; DAN, H.; LI, Y. Identification of a second flagellin gene and functional characterization of a  $\sigma^{70}$ -like promoter upstream of a *Leptospira borgpetersenii* *flaB* gene. **Current Microbiology**. v. 48, p. 145-152, 2004.

LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**. v., 26, p. 2567-82, 2005.

LISTA, F.; FAGGIONI, G.; VALJEVAC, S.; CIAMMARUCONI, A.; VAISSARE, J.; LE DOUJET, C.; GORGE, O.; DE SANTIS, R.; CARATTOLI, A.; CIERVO, A.; FASANELLA, A.; ORSINI, F.; D'AMELIO, R.; POURCEL, C.; CASSONE, A.; VERGNAUD, G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. **BMC Microbiology**. v. 6, p. 6-33, 2006.

LOUVEL, H.; PICARDEAU, M. Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. **Current Protocols on Microbiology**. Capítulo 12, 2007.

MAJED, Z.; BELLENGER, D.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 539–545, 2005.

MARTINEZ, S. R.; PEREZ, S. A.; BARO, S. M.; ALVAREZ, A. M.; MENENDEZ, H. J.; DIAZ, G. M.; CRUZ, D. L. P.; DE LOS, R. G.; MONTOYA, B. B.; SIERRA, G. G.; ARMESTO, D. R.; SALTAREN, C. A.; SABOURNIN, R. O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 8, p. 385-392, 2000.

MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinions in Infectious Disease**, v.18, p. 376-386, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Leptospirose**, 2o ed. Brasília: FNS, p.98, 1995.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P.L, HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**. v. 186, p. 2164-72, 2004<sup>a</sup>.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal on Medical Biological Research**. v. 37, p. 459-77, 2004<sup>b</sup>.

NEDERBRAGT, A. J.; BALASINGHAM, A.; SIREVAG, R.; UTKILEN, H.; JAKOBSEN, K. S.; ANDERSON-GLENN, M. J. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Legionella pneumophila* using multi-colored capillary electrophoresis. **Journal of Microbiology Methods**. v. 73, p. 111-7, 2008.

PAVAN, M. E.; CAIRO, F.; BRIHUEGA, B.; SAMARTINO, L. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. **Immunology, Microbiology and Infection Diseases**. v. 31, p. 37-45, 2008.

PEREIRA, M. M.; MATSUO, M. G. S.; BAUAB, A. R.; VASCONCELOS, S. A.; MORAES, Z. M.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. A Clonal Subpopulation of *Leptospira interrogans* Sensu Stricto Is the Major Cause of Leptospirosis Outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 450–452, 2000.

PEROLAT, P.; LECUYER, I.; POSTIC, D.; BARANTON, G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. **Research on Microbiology**. v. 144, p. 5–15, 1993.

PEROLAT, P.; MERIEN, F.; ELLIS, W. A.; BARANTON, G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, p. 1949–1957, 1994.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**. v. 3, p. 1607-15, 2008.

POURCEL, C.; VISCA, P.; AFSHAR, B.; D'AREZZO, S.; VERGNAUD, G.; FRY, N. K. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, p. 1190-9, 2007.

RALPH, D.; McCLELLAND, M.; WELSH, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. **Journal of Bacteriology**. v. 175, p. 973-81, 1993.

RAMADASS, P.; MEERARANI, S.; VENKATESHA, M. D.; SENTHILKUMAR, A.; NACHIMUTHU, K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, p. 575-576, 1997.

RAMISSE V.; HOUSSU, P.; HERNANDEZ, E.; DENOEUDE, F.; HILAIRE, V.; LISANTI, O.; RAMISSE, F.; CAVALLO, J. D.; VERGNAUD, G. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5722-5730, 2004.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-

based assay: a public health tool. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.101, p. 56-62, 2006.

ROY, S.; BISWAS, D.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SEHGAL, S. C. A 22-mer primer enhances discriminatory power of AP-PCR fingerprinting technique in characterization of leptospires. **Tropical Medicine & International Health**. v. 9, p. 1203-1209, 2004.

SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR, A. V. The serovars of *Leptospira interrogans* isolated from cases of human leptospirosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 34, p. 217-21, 1992.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature**. v.18, p. 233-234, 2000.

SEHGAL, S. C. Epidemiological patterns of leptospirosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 24, p. 310-1, 2006.

SEGERS, R. P.; VAN DER DRIFT, A.; DE NIJS, A.; CORCIONE, P.; VAN DER ZEIJST, B. A.; GAASTRA, W. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo . **Infection and Immunity**. v. 58, p. 2177 –85, 1990.

SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; CAMARGO, E. D.; BATISTA, L.; VAZ, A. J.; ROMERO, E. C.; BRANDÃO, A. P. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.56, p. 650-655, 1997.

SINAN (SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO).

Disponível em: <http://dtr2007.saude.gov.br/sinanweb>. Acessado em 25/09/2008.

SMYTH, J. A.; FITZPATRICK, D. A.; ELLIS, W. A. Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. **Veterinary Research**. v. 6, p. 539-42, 1999.

SMYTHE, L. D.; SMITH, I.L.; SMITH, G. A.; DOHNT, M. F.; SYMONDS, M. L.; BARNETT, L. J.; MCKAY, D. B. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infection Diseases**. v. 2, p. 13–20, 2002.

OCHOA, J. E.; SÁNCHEZ, A.; RUIZ, I. Epidemiology of leptospirosis in a livestock production area of the Andes. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 7, p. 325-31, 2000.

THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; MOSELEY, S. L.; KINGSCOTE, B. New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup pomona by restriction endonuclease analysis: serovar kennewicki. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 21, p. 585-7, 1985.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. **Expert Review of Molecular Diagnostic**. v. 8, p. 53-61, 2008.

VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 49, p. p. 22-7, 2007.

VIJAYACHARI, P.; SEHGAL, S. C. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospire. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 24, p. 320-2, 2006.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 14, p. 527-538, 2001.



WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.** p. 109, 2003.

WILSON, T.; CARSON, J.; BOWMAN, J. Optimisation of one-tube PCRELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. **Journal of Microbiological Methods.** v. 51, p. 163-170, 2002.

YURI, K.; TAKAMOTO, Y.; OKADA, M.; HIRAMUNE, T.; KIKUCHI, N.; YANAGAWA, R. Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. **Infection and Immunity.** v., 61, p. 2270 –72, 1993.

ZHUO, J. T.; WANG, S. S.; LAN, W. L. A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.** v. 24,p. 33-42, 1995.

ZUERNER, R. L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of Bacteriology.** v. 186, p. 2818–2828, 2004