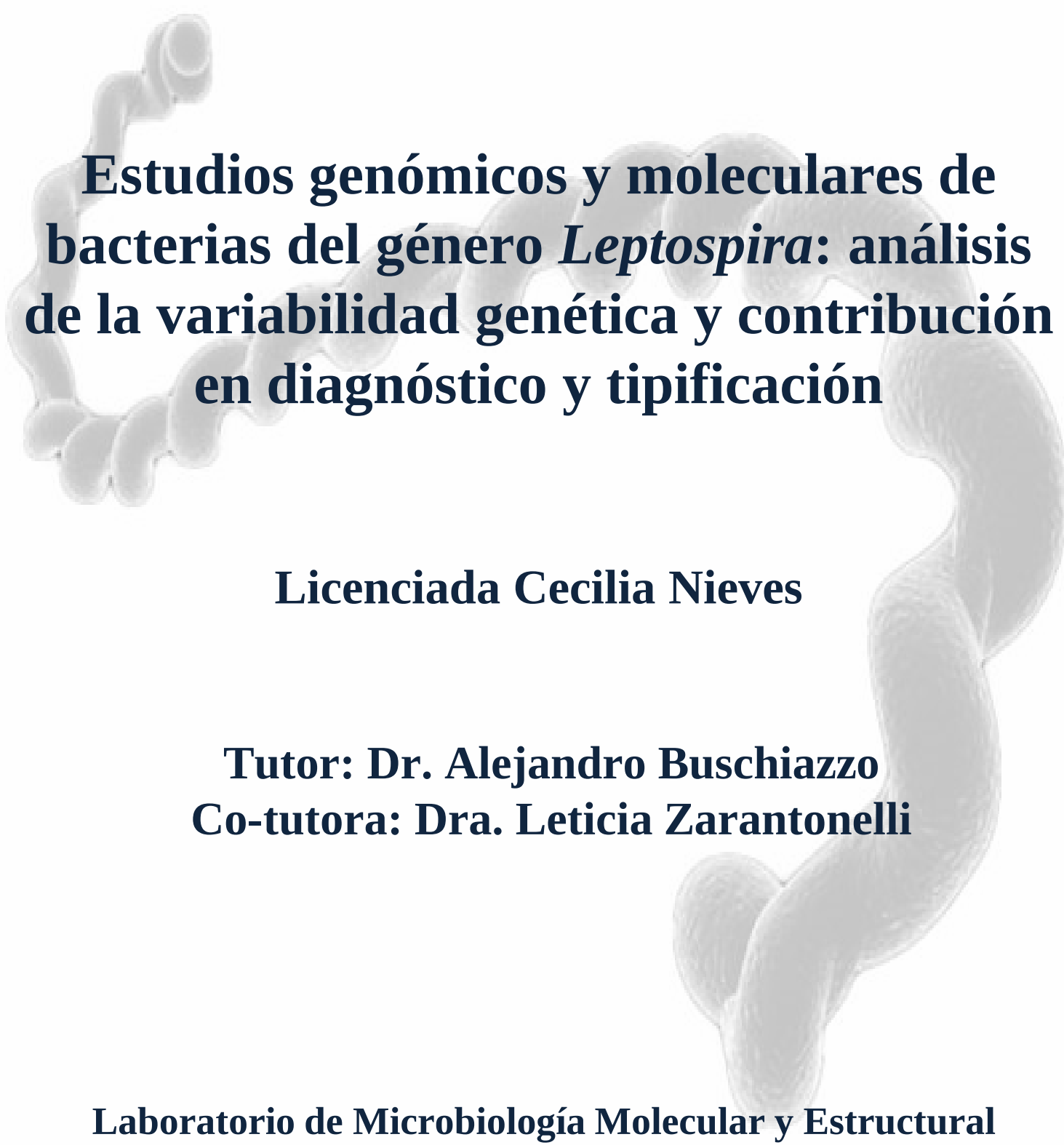


Tesis de Maestría
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas



Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación

Licenciada Cecilia Nieves

Tutor: Dr. Alejandro Buschiazzo
Co-tutora: Dra. Leticia Zarantonelli

Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural
Unidad Mixta Pasteur + INIA
Institut Pasteur de Montevideo

Tesis de Maestría

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación

Licenciada Cecilia Nieves

Tutor: Dr. Alejandro Buschiazzo

Co-tutora: Dra. Leticia Zarantonelli

Tribunal

Dra. Carolina Márquez

Dr. Odir Dellagostin

Dra. María Eugenia Francia

Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural

Unidad Mixta Pasteur + INIA

Institut Pasteur de Montevideo

ÍNDICE

ÍNDICE TEMÁTICO

	Resumen	10
1	Introducción	11
1.1	Leptospirosis	12
1.1.1	Generalidades	12
1.2	<i>Leptospira</i> : el agente causal de la leptospirosis	15
1.2.1	Características morfológicas y de crecimiento	15
1.2.2	Taxonomía	18
1.2.3	Patogenia	21
1.2.3.1	Lipopolisacárido	21
1.2.3.2	Proteínas de membrana externa	26
1.2.3.2.1	Familia Lig	26
1.2.3.2.2	LipL32	27
1.2.3.2.3	Loa22	29
1.3	Aplicación de la biología molecular en el estudio de <i>Leptospira</i>	30
1.3.1	Diagnóstico por PCR	30
1.3.2	Identificación y tipificación molecular de <i>Leptospira</i> spp.	31
1.3.2.1	Determinación de especie mediante amplificación y secuenciación del gen <i>rrs</i>	31
1.3.2.2	Tipificación mediante amplificación de alelos MLVA	32
1.3.2.3	Genotipificación por medio de MLST	33
1.4	Genómica de <i>Leptospira</i>	34
1.4.1	Organización del genoma y características generales	34
2	Objetivos	40
2.1	Objetivo general	41
2.1.1	Objetivos específicos	41
3	Materiales y métodos	42
3.1	Procesamiento de muestras biológicas de animales con sospecha de leptospirosis	43
3.1.1	Orinas	43
3.1.2	Muestras de tejidos de material cadavérico	43
3.1.2.1	Procedentes de bovinos	43
3.1.2.2	Procedentes de jabalíes	44
3.1.3	Extracción de ADN	44
3.2	Detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> mediante amplificación del gen <i>lipL32</i>	45
3.2.1	PCR convencional	45
3.2.2	PCR en tiempo real	47

3.3	Cultivo y aislamiento cepas de <i>Leptospira</i> spp.	49
3.3.1	Preparación de EMJH suplementado con seroalbúmina bovina	49
3.3.2	Cultivo de <i>Leptospira</i> spp.	50
3.3.3	Conservación de cepas	51
3.4	Caracterización de cepas autóctonas de <i>Leptospira</i> spp.	51
3.4.1	Determinación de especie mediante amplificación y secuenciación parcial del gen de ARNr 16S	51
3.4.2	Genotipificación mediante amplificación y secuenciación parcial del gen <i>secY</i>	52
3.4.3	Análisis filogenético a partir de productos de secuenciación de <i>rrs</i> y <i>secY</i>	53
3.4.4	Determinación de serogrupo mediante reacción con antisueros de referencia por MAT	53
3.4.5	Asignación de serovar presuntivo mediante análisis de VNTR	55
3.5	Secuenciación de genomas completos	57
3.5.1	Extracción de ADN y determinación de su calidad	57
3.5.2	Construcción de librerías de ADN	57
3.5.3	Secuenciación de genomas completos empleando el sistema MiSeq de Illumina	58
3.5.4	Secuenciación de genomas completos empleando el sistema NextSeq 500 de Illumina	59
3.6	Ensamblaje, anotación y análisis de genomas	59
3.6.1	Evaluación de calidad de los datos crudos de secuenciación	59
3.6.2	Eliminación de secuencias adaptadoras	59
3.6.3	Ensamblaje <i>de novo</i>	60
3.6.4	Evaluación de la calidad del genoma ensamblado	60
3.6.5	Anotación de genomas	60
3.6.6	Análisis del pangenoma	61
3.6.7	Análisis del genoma-núcleo	61
3.6.8	Análisis de genes MLST	62
4	Resultados	63
4.1	Detección de ADN específico de especies patógenas de <i>Leptospira</i> mediante amplificación del gen <i>lipL32</i>	64
4.1.1	PCR convencional	64
4.1.1.1	Determinación de la especificidad y sensibilidad analítica de la PCR	64
4.1.1.2	Aplicación de la PCR convencional para la detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> en muestras de orina	66
4.1.1.3	Aplicación de la PCR convencional para la detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> en muestras de tejido	67
4.1.2	Puesta a punto y validación de una PCR en tiempo real	68
4.1.2.1	Construcción de la curva estándar de ADN	68

4.1.2.2	Determinación de la sensibilidad analítica	69
4.1.2.3	Determinación de la concentración óptima de control interno de amplificación	70
4.1.2.4	Evaluación de la especificidad	73
4.1.2.5	Aplicación del protocolo de qPCR para la detección de ADN específico de especies patógenas de <i>Leptospira</i> en muestras biológicas	75
4.2	Aplicación de métodos moleculares y serológicos para tipificar aislamientos autóctonos de <i>Leptospira</i> spp.	78
4.2.1	Asignación de especie: amplificación y secuenciación parcial del gen <i>rrs</i>	78
4.2.2	Determinación de serogrupo: test de microaglutinación	79
4.2.3	Inferencia de serovar: amplificación de alelos VNTR	80
4.2.4	Genotipificación mediante amplificación y secuenciación parcial del gen <i>secY</i>	81
4.3	Secuenciación de genomas completos	83
4.3.1	Análisis de calidad de los genomas ensamblados	83
4.3.2	Anotación de genomas	85
4.3.3	Análisis genómico	87
4.3.3.1	Pangenoma	87
4.3.3.2	Genoma accesorio	89
4.3.3.3	Genoma central	89
4.3.3.4	Análisis de alelos MLST	91
5	Discusión	94
6	Conclusiones	105
7	Agradecimientos	107
8	Bibliografía	109
9	Anexos	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de transmisión de <i>Leptospira</i>	13
Figura 2	Morfología de <i>Leptospira</i>	16
Figura 3	Pared celular de <i>Leptospira</i>	17
Figura 4	Estructura general del LPS en bacterias Gram-negativas	22
Figura 5	Estructura del locus <i>rfb</i> en <i>Leptospira</i>	24
Figura 6	Niveles de expresión de antígeno O	25
Figura 7	Inmunohistoquímica a partir de tejido renal de hámster infectado con <i>L. kirschneri</i>	28
Figura 8	Representación gráfica del genoma de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai	34
Figura 9	Número de genes compartidos entre <i>L. biflexa</i> , <i>L. borgpetersenii</i> y <i>L. interrogans</i>	35
Figura 10	Estimación del pangenoma de <i>Leptospira</i>	36
Figura 11	Evaluación de la especificidad para la amplificación del gen <i>lipL32</i>	65
Figura 12	Sensibilidad analítica de la PCR para <i>lipL32</i>	66
Figura 13	Efecto inhibitorio en muchas muestras de orina en la reacción de PCR	66
Figura 14	Distribución de reacciones positivas para <i>lipL32</i> , discriminadas por tipo de muestra procesada	67
Figura 15	PCR <i>lipL32</i> sobre distintas muestras de tejido	67
Figura 16	Sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real para <i>lipL32</i>	69
Figura 17	Curva de <i>melting</i>	70
Figura 18	Relación de concentración entre IAC y ADN blanco mediante PCR convencional	71
Figura 19	Relación de concentración entre IAC y ADN blanco mediante PCR a tiempo real	72
Figura 20	Especificidad de la reacción	73
Figura 21	Productos de amplificación para las diferentes especies	73
Figura 22	Amplificación de <i>lipL32</i> en muestras de riñones de jabalí	75
Figura 23	Análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen <i>rrs</i>	78
Figura 24	Perfil VNTR para cepas aisladas de <i>L. interrogans</i> y <i>L. borgpetersenii</i>	80
Figura 25	Análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen <i>secY</i>	82
Figura 26	Número de genes constituyentes del pangenoma a nivel de género <i>Leptospira</i> incluyendo todos los aislamientos secuenciados	88
Figura 27	Número de genes constituyentes del pangenoma en cada especie secuenciada	88
Figura 28	Distribución de genes únicos presentes por serogrupo secuenciado	89
Figura 29	Análisis filogenético de los aislamientos basándose en los genes compartidos (genoma <i>core</i>)	90
Figura 30	Análisis de genes MLST pertenecientes al esquema 1	92
Figura 31	Análisis de genes MLST pertenecientes al esquema 2 y 3	93
Figura 32	Variabilidad genética entre cepas pertenecientes a <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Especies del género <i>Leptospira</i>	19
Tabla 2	Algunas serovariedades pertenecientes a <i>Leptospira interrogans sensu lato</i> , y su relación con la clasificación en serogrupos	20
Tabla 3	Ejemplos de serovares compartidos entre distintas especies	20
Tabla 4	Comparativa entre diferentes plataformas de secuenciación	38
Tabla 5	Concentraciones de reactivos para la PCR <i>lipL32</i>	46
Tabla 6	Parámetros generales de oligonucleótidos diseñados para la detección de <i>lipL32</i> mediante qPCR	47
Tabla 7	Control interno de amplificación para la qPCR de <i>lipL32</i>	49
Tabla 8	Composición de medio base, suplemento y medio EMJH suplementado	50
Tabla 9	Concentraciones de reactivos para la amplificación del gen <i>rrs</i>	51
Tabla 10	Antiserosos de referencia usados en la determinación de serogrupo mediante MAT	54
Tabla 11	Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los diferentes alelos VNTR	55
Tabla 12	Concentraciones de reactivos para la PCR de repetidos en tándem	56
Tabla 13	Loci VNTR propuesto para <i>L. interrogans</i> y <i>L. borgpetersenii</i>	57
Tabla 14	Especies y serovares de <i>Leptospira</i> empleados en la determinación de especificidad para la PCR <i>lipL32</i>	64
Tabla 15	Correspondencia entre copias genómicas y número de leptospiras	68
Tabla 16	Temperaturas de <i>melting</i> obtenidas para diferentes especies de <i>Leptospira</i> y otros géneros bacterianos	74
Tabla 17	Valores de C _q y temperaturas de <i>melting</i> para las diferentes muestras de riñón de jabalí ensayadas	76
Tabla 18	Estimación de carga bacteriana en muestras positivas	77
Tabla 19	Determinación de serogrupo para aislamientos autóctonos	79
Tabla 20	Identificación de cepas circulantes a nivel nacional	81
Tabla 21	Genotipo <i>secY</i> para los diferentes aislamientos	83
Tabla 22	Criterio utilizado para la categorización de la calidad de los genomas ensamblados	84
Tabla 23	Calidad de los genomas obtenidos	85
Tabla 24	Características generales de los genomas secuenciados	86
Tabla 25	<i>Average Nucleotide Identity</i> (ANI) entre las diferentes especies secuenciadas	87
Tabla 26	Secuenciotipos MLST obtenidos para los aislamientos de cada especie	91
Tabla A.1	Genes encontrados en el genoma de aislamientos individuales, y ausentes en los restantes 39 genomas	123
Tabla A.2	Genes encontrados en todos los aislamientos (<i>core genome</i>)	130

ABREVIACIONES

5'FU	5'-Fluorouracilo
ADN(r)	Ácido desoxirribonucleico (ribosomal)
ANI	Identidad nucleotídica promedio (del inglés, <i>Average Nucleotide Identity</i>)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAAT	Prueba de aglutinación cruzada y absorción (del inglés, <i>Cross-Agglutinin Absorption Test</i>)
CDS	Secuencias codificantes (del inglés, <i>Coding Sequences</i>)
CEV	Virus que infecta peces carpa produciendo edemas (del inglés, <i>Carp edema virus</i>)
Cq	Ciclo umbral de detección (del inglés, <i>Cycle of quantification</i>)
CRISPR/Cas	Sistema inmune en procariontes (del inglés, <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequence proteins</i>).
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato
E	Eficiencia de reacción
EMJH	Medio de cultivo para <i>Leptospira</i> spp. (<i>Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris</i>)
IAC	Control interno de amplificación (del inglés, <i>Internal Amplification Control</i>)
Lig	Proteínas leptospirales similares a las inmunoglobulinas (del inglés, <i>Leptospiral Ig-like protein</i>)
LOD	Límite de detección (del inglés, <i>Limit of Detection</i>)
LPS	Lipopolisacárido
MAPIA	Inmunoensayo de impresión de multiantígeno (del inglés, <i>Multi-antigen print immunoassay</i>)
MAT	Prueba de aglutinación microscópica (del inglés, <i>Microscopic Agglutination Test</i>)
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (del inglés, <i>Multilocus Sequence Typing</i>)
MLVA	Análisis multilocus de VNTRs (del inglés, <i>Multiple Locus VNTR Analysis</i>)
NGS	Secuenciación de segunda generación (del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i>)
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal (del francés, <i>Office International des Épizooties</i>)
OMP	Proteína de membrana externa (del inglés, <i>Outer Membrane Protein</i>)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis en gel en campo pulsado (del inglés, <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>)
REA	Análisis por endonucleasas de restricción (del inglés, <i>Restriction Endonuclease Analysis</i>)
ST	Secuenciotipo o perfil alélico en MLST (del inglés, <i>Sequence Type</i>)
TCS	Sistemas de dos componentes (del inglés, <i>Two Components Systems</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés, <i>Toll Like Receptor</i>)
Tm	Temperatura de <i>melting</i> (desnaturalización)
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem (del inglés, <i>Variable-number Tandem Repeat</i>)

RESUMEN

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución a nivel mundial. Esta enfermedad infecciosa de impacto médico, también es relevante en salud animal, afectando a varias especies de importancia pecuaria tales como bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y equinos. En Uruguay constituye uno de los principales problemas reproductivos en bovinos, estimándose alrededor de un 25% de abortos de origen infeccioso como consecuencia de esta enfermedad, con impacto directo en la economía del país. Asimismo, puede conducir a nacimientos de terneros débiles, merma en la producción lechera y muerte en animales jóvenes. Además de la evaluación sintomatológica, la leptospirosis es principalmente diagnosticada a través métodos serológicos, siendo el MAT la técnica de referencia, en la cual se cuantifican anticuerpos anti-leptospiras en suero de animales sospechosos de enfermedad. Este método presenta varias desventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad, no permitiendo diferenciar entre anticuerpos naturales y aquellos provenientes de vacunación, ni asignar el serovar infectivo. En aislamientos de *Leptospira* spp. para la determinación de serovar también se emplea un método serológico como referencia, el CAAT, que debido a su laboriosidad y elevado costo son muy pocos los laboratorios que lo realizan. En Uruguay, la base del diagnóstico de la leptospirosis animal es serológica, por lo que teniendo en cuenta este escenario, el desarrollo de estrategias de biología molecular que complementen las estrategias de diagnóstico así como la aplicación de metodologías de tipificación que permitan la caracterización de aislamientos a partir de muestras biológicas se reconocen como necesarios para avanzar en el entendimiento epidemiológico de esta zoonosis. Con este propósito en este trabajo de Maestría se buscó desarrollar métodos moleculares que complementen los métodos serológicos disponibles en el país. Mediante el desarrollo y aplicación de diversas técnicas basadas en PCR para la detección y tipificación de *Leptospira*, fue posible evidenciar la presencia del agente tanto en diferentes matrices biológicas de bovinos infectados y de animales salvajes que forman parte del ciclo de transmisión de la bacteria, así como también caracterizar una colección de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. Las variantes caracterizadas correspondieron a las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*, que comprenden un total de 12 serovariedades diferentes. La implementación de un protocolo de PCR a tiempo real permitió aumentar la sensibilidad obtenida en PCR convencional, pudiéndose detectar la presencia de *Leptospira* en tejidos provenientes de jabalíes. La secuenciación de los genomas completos de los aislamientos autóctonos permitió confirmar las especies previamente caracterizadas, observándose gran variabilidad genética entre las diferentes cepas, incluso en aquellas pertenecientes a la misma serovariedad. El análisis del pangenoma permitió diferenciar entre un grupo de genes claramente conservados en los diferentes aislados, relacionados a funciones esenciales del metabolismo celular, y un subgrupo de genes únicos asociados a serogrupos e incluso a aislamientos específicos, donde priman genes codificantes para proteínas involucradas en mecanismos de regulación, quimiotaxis, sistemas de eflujo, y enzimas modificadoras de azúcares. Una exhaustiva exploración de estos datos será de suma importancia para el entendimiento de la biología de *Leptospira*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leptospirosis

1.1.1 Generalidades

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica ampliamente distribuida a nivel mundial. Causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* (Bharti et al., 2003; Levett, 2001), afecta a casi todas las especies de mamíferos, tanto domésticos como salvajes (Adler, 2015). Su incidencia es mayor en países tropicales y subtropicales debido a las condiciones de humedad y temperatura que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, propiciando así la transmisión de la enfermedad (Bharti et al., 2003; Levett, 2001).

La infección en humanos se produce a través del contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados (Levett, 2001), reportándose anualmente alrededor de 1.000.000 de casos nuevos y 60.000 muertes en el mundo (Costa et al., 2015). La subestimación de su morbilidad y mortalidad han contribuido a que la leptospirosis se encuentre dentro del grupo de enfermedades desatendidas, junto con otras enfermedades tropicales como la leishmaniasis visceral y el dengue severo, respecto a las cuales la carga de morbilidad de la leptospirosis es mayor (Costa et al., 2015). Puede estar asociada a exposiciones ocupacionales (trabajo con animales), recreacionales en general relativos a deportes acuáticos, o bien más comúnmente a entornos urbanos con altas poblaciones de roedores infectados transmisores. Además del fuerte impacto en salud pública, la leptospirosis presenta suma relevancia en el área veterinaria, pues son afectados animales de interés pecuario como bovinos, suinos, equinos y ovinos, induciendo pérdidas económicas (Adler, 2015). En Uruguay se ha reportado que aproximadamente un 25-30% de los abortos bovinos por causas infecciosas son debido a leptospirosis, estimaciones que fueron realizadas por histopatología y serología de las hembras que abortan, volviéndose así uno de los principales problemas reproductivos a nivel nacional (Easton, 2006). En la misma línea, las estimaciones de seroprevalencia han sido y continúan siendo particularmente elevadas en Uruguay: del 25-50% a nivel de animales individuales, y del 50-70% en cuanto a la proporción de predios afectados (Caffarena et al., 1971 ; Repiso et al., 2005).

La sintomatología de la infección es muy variada pudiendo presentarse desde formas subclínicas sin manifestaciones evidentes, hasta casos severos, dependiendo de múltiples factores tales como la especie infectada y su estado inmunitario, la carga bacteriana inicial y la especie de *Leptospira* y serovariedad. Este último factor resulta de gran interés, ya que se ha establecido cierta asociación entre determinadas serovariedades y hospederos, donde la infección es típicamente asintomática o leve, derivando en la clasificación de dos tipos de hospederos: i) hospederos de

mantenimiento, y ii) hospederos accidentales (Levett, 2001). Los primeros se caracterizan por una infección crónica, sin sintomatología aparente, debido a que las cepas patógenas infectivas se encuentran “adaptadas” al mismo; la bacteria coloniza el túbulo renal proximal, siendo posteriormente excretada en la orina, contaminando suelo y agua; y constituyendo la principal fuente de diseminación de la enfermedad (**Figura 1**). Por otra parte, los hospederos accidentales, como el humano, el perro, el hámster, entre otros, experimentan una enfermedad aguda, en la cual además de la presencia de fiebre e ictericia, se evidencian complicaciones tales como insuficiencia renal y hepática, e incluso manifestaciones pulmonares hemorrágicas (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010a), pudiendo culminar con la muerte del individuo. En humanos, la manifestación más grave de la enfermedad es el síndrome de Weil, con tasas de mortalidad de hasta 50% (Levett, 2001). Sin embargo, pese a que esta asociación entre serovariedades y hospederos ha sido postulada, se desconocen las bases moleculares de dicha especificidad (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010a), y no se cuenta con estudios experimentales sistemáticos que prueben su validez general.

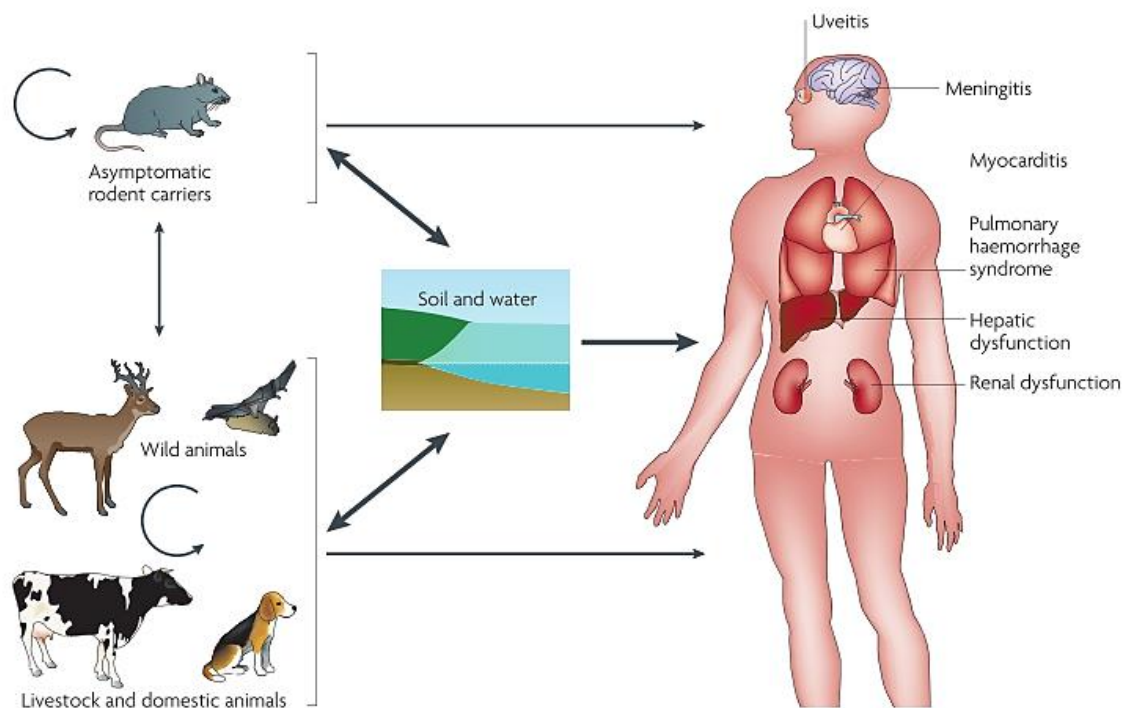


Figura 1. Ciclo de transmisión de *Leptospira*. El ciclo de transmisión de *Leptospira* spp. incluye hospederos de mantenimiento (sin sintomatología, son la principal fuente de transmisión de la enfermedad), y hospederos accidentales (como el humano, se infecta por contacto directo o indirecto con animales infectados). Las leptospiras penetran a través de abrasiones en la piel o membranas mucosas, ingresan al torrente sanguíneo y se diseminan en diferentes tejidos. En hospederos accidentales, se desarrollan diversas sintomatologías tales como fiebre, disfunción hepática, falla renal, síndrome hemorrágico pulmonar, miocarditis, uveítis y meningoencefalitis. Extraído de (Ko et al., 2009).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza principalmente por métodos serológicos, mediante detección de anticuerpos anti-leptospiras en sangre, usando la prueba de aglutinación microscópica, MAT (Musso & Lascola, 2013; Picardeau, 2013). Esta técnica consiste en enfrentar el suero proveniente del hospedero con sospecha de enfermedad a cultivos de leptospiras, y evaluar el grado de aglutinación mediante microscopía de campo oscuro; se considera reacción positiva aquella que muestre un 50% de aglutinación, dejando 50% de células libres respecto al control sin aglutinar que contiene únicamente la bacteria (Faine et al., 1999). El MAT es considerada la prueba diagnóstica de referencia, aun cuando tiene una serie de desventajas: i) baja sensibilidad, sobre todo de manifiesto en el caso de hospederos crónicamente infectados y los bajos títulos que típicamente exhiben; ii) imposibilidad de diferenciar anticuerpos provenientes de vacunación de aquellos generados por infección; iii) incapacidad de inferir el serovar infectivo, ya que las reacciones cruzadas a nivel de serovar e incluso serogrupo son frecuentes, principalmente en las primeras semanas de infección (Musso & Lascola, 2013; OIE, 2004). A su vez, no siempre hay correlación entre el serogrupo identificado por MAT y la identificación luego de aislada la cepa (Picardeau, 2013). El MAT además es una técnica laboriosa ya que requiere mantener las cepas de leptospiras de referencia en continuo cultivo, y la interpretación de los resultados de aglutinación es cualitativa y muy dependiente de la experiencia del operador.

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, la terapia por excelencia es la utilización de antibióticos, en particular los beta-lactámicos. El más empleado dentro de este grupo es la penicilina, aunque ampicilina y amoxicilina también se emplean, en casos menos severos. Se ha evaluado el efecto de otros antibióticos, entre los que se destacan macrólidos (azitromicina), tetraciclinas (doxiciclina), cloranfenicol e incluso otros beta-lactámicos como las cefalosporinas. A pesar de ser la penicilina una de las más utilizadas, no hay evidencias de su superioridad frente a otros antibióticos (Charan et al., 2013).

Por último, cabe mencionar que el control y prevención de la enfermedad se lleva a cabo mediante vacunación, en particular en aplicaciones veterinarias. La investigación en el área de vacunas contra la leptospirosis ha experimentado grandes avances, y se han abordado distintos tipos de formulaciones (Dellagostin et al., 2017): i) basadas en proteínas recombinantes, especialmente proteínas de membrana externa (OmpL1, LigA, LigB), lipoproteínas (LipL32, LipL41) y factores de virulencia (FlaA, FlaB); ii) basadas en el lipopolisacárido de superficie (LPS); iii) vacunas de ADN; y iv) vacunas formuladas a partir de bacterias atenuadas o inactivadas (bacterinas). Estas últimas son las más ampliamente utilizadas, especialmente en animales domésticos, y las únicas disponibles

comercialmente, existiendo una gran variedad de formulaciones. Para humanos, actualmente sólo existen dos vacunas disponibles, vax-SPIRAL (Cuba) formulada con tres serovariedades de *Leptospira* (Martínez et al., 2004), y Spirolept (Francia), que incluye únicamente una serovariedad; ambas presentan un uso limitado y dirigido a poblaciones expuestas. Si bien demuestran ser eficaces, las bacterinas no generan linfocitos de memoria por lo que la protección es muy limitada en el tiempo, y se restringe a los serovares incluidos en la formulación, sin protección cruzada contra serovares heterólogos (Dib et al., 2014; Suepaul et al., 2010). Es por ello que, al igual que para el diagnóstico por MAT, la formulación de vacunas requiere del conocimiento de las serovariedades circulantes en una región dada. En aplicaciones veterinarias, según la OIE una vacuna debe formularse para una especie en concreto (en la cual se prueba su eficacia), y con los serovares (o incluso genotipos) que efectivamente infectan a dicha especie en un sitio geográfico determinado (OIE, 2004).

1.2 *Leptospira*: agente causal de la leptospirosis

1.2.1 Características morfológicas y de crecimiento

Bacterias del género *Leptospira* fueron observadas por primera vez en 1907, cuando el estadounidense Arthur Stimson evidenció mediante tinción con plata la presencia de espiroquetas en los túbulos renales de pacientes cuya aparente causa de muerte había sido fiebre amarilla. Debido a su particular morfología, en la cual se destacan sus extremos en forma de gancho semejantes a un signo de interrogación, Stimson decidió nombrarla como *Spirochaeta interrogans* (Levett, 2001). No obstante, el primer aislamiento de *Leptospira* sp. se obtuvo años más tarde, en 1916, a partir de sangre de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Weil (Inada et al., 1916).

Los miembros del género *Leptospira* son bacterias pertenecientes al filo Spirochaetes, orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y se clasifican en tres grandes grupos: patógenas, intermedias y saprófitas, siendo las primeras el agente etiológico de la leptospirosis (Ko et al., 2009). Poseen un diámetro de aproximadamente 0.1-0.3 μm , y una longitud de 6-20 μm , con uno o los dos extremos curvados en forma de gancho (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010a; Levett, 2001) (**Figura 2**). Debido a su pequeño diámetro y a la imposibilidad de utilizar métodos convencionales de coloración, su visualización únicamente es posible mediante microscopía de campo oscuro, contraste de fase o preparaciones impregnadas con plata. A diferencia de las cepas de laboratorio mantenidas en cultivo mediante sucesivos pasajes, las leptospiras patógenas presentan una longitud menor en su aislamiento inicial; sin embargo, luego de ser preservadas en condiciones de cultivo su longitud

aumenta, al mismo tiempo que su movilidad disminuye. Así, su morfología varía de acuerdo a la edad del cultivo, llegando a evidenciarse cuerpos esféricos en cultivos muy envejecidos (Adler, 2015) (Figura 2).

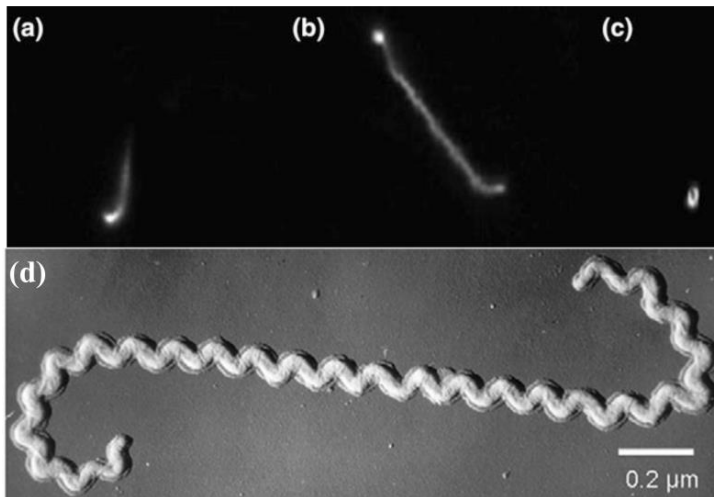


Figura 2. Morfología de *Leptospira*. Microscopía de campo oscuro para tres estadios de crecimiento de un cultivo de *Leptospira interrogans* (panel superior). (a) menor longitud, mayor movilidad; (b) mayor longitud, movilidad intermedia; (c) esférica.; (d) Fotomicrografía de *Leptospira* sp. (mayor magnificación). Se observan bien los extremos en forma de gancho, y la estructura espiralada del cuerpo celular. (a), (b) y (c) extraídas de (Adler, 2015); (d) extraída de (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010a).

La motilidad de estas bacterias se debe a la presencia de dos endoflagelos, uno en cada polo de la célula, cuyos filamentos están confinados en el espacio periplásmico. La rotación de dichos flagelos es responsable de los movimientos alrededor del eje central de la célula, y de traslación. El movimiento de traslación o natación, lo logran rotando los motores de sus dos flagelos en direcciones opuestas (a favor y en contra de las agujas del reloj), situación en la que un extremo estará en forma de gancho y el otro en forma “espiralada”, resultando en un movimiento de traslación en el sentido del extremo espiralado. Cuando los dos motores flagelares rotan en el mismo sentido, los dos extremos estarán en forma de gancho o espiralados, sin natación efectiva (movimientos de “flexing”), aunque con movimiento rotacional detectable (Adler, 2015; Tahara et al., 2018; Wolgemuth, 2015). *Leptospira* presenta velocidades de natación elevadas, aun en medios de gran viscosidad, lo que incrementa su sobrevivencia en ambientes naturales, y facilita la invasión de tejidos en el organismo hospedero (Goldstein & Charon, 1988; Takabe et al., 2013).

La envoltura celular de las leptospiras muestra una estructura de doble membrana, similar a la de bacterias Gram-negativas. Entre la membrana interna y externa está el periplasma, en el cual se encuentra una pared de peptidoglicano (Bharti et al., 2003; Cullen et al., 2005; Picardeau, 2017). Esta capa de peptidoglicano es la principal responsable, junto con proteínas del citoesqueleto, de la forma espiralada de la bacteria (Slamti et al., 2011). En cuanto a la membrana externa, presenta diferencias en composición respecto a otras bacterias espiroquetas como *Borrelia* y *Treponema*, que no expresan lipopolisacárido (LPS) y tienen baja proporción de proteínas de membrana; en el caso de *Leptospira*, la membrana externa está sustancialmente decorada por LPS y contiene una gran

variedad de proteínas y lipoproteínas (**Figura 3**), muchas de las cuales tienen sus respectivas homólogas en bacterias Gram-negativas (Haake, 2000; Haake & Matsunaga, 2010). A diferencia de estas últimas, el LPS de *Leptospira* presenta una toxicidad fuertemente reducida (Levett, 2001), y su grosor varía entre especies patógenas y saprófitas .

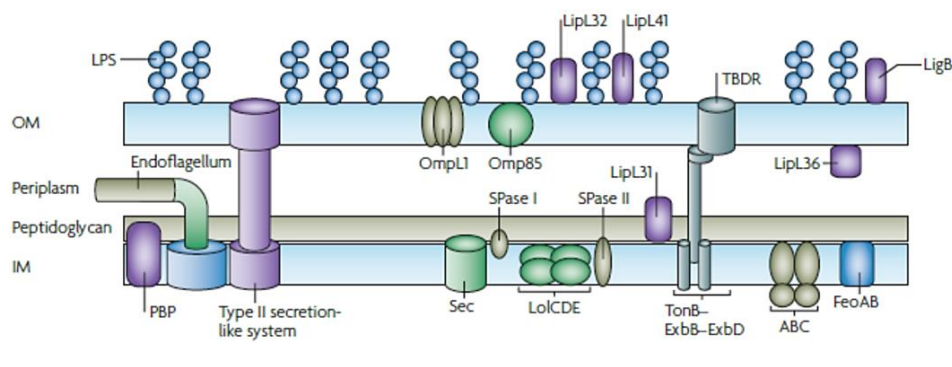


Figura 3. Pared celular de *Leptospira*. Esquema extraído de (Ko et al., 2009).

Las leptospiras son bacterias aerobias o microaerofílicas, tanto oxidasa como catalasa positivas, por lo que son capaces de metabolizar el oxígeno. Presentan temperaturas óptimas de crecimiento de 28-30 °C, en un rango de pH de 7.2-7.6, y tiempos de duplicación *in vitro* largos de 6-18 horas. Las especies patógenas muestran tiempos de duplicación en rangos más elevados (típicamente más lentos que las saprófitas), y con una fase de retardo para la iniciación del crecimiento de días e incluso semanas.

Los requerimientos nutricionales esenciales para su crecimiento son fuentes de carbono y nitrógeno, así como la presencia de ciertas vitaminas (tiamina, biotina) y otros suplementos. Los ácidos grasos de cadena larga son una fuente esencial de carbono, pero a la vez son tóxicos, por lo que se requiere de la adición de detoxificantes al medio de cultivo tales como albúmina o polisorbato (Tween), que aportan a los ácidos grasos en una forma no tóxica mediante distintos mecanismos. El nitrógeno, también indispensable, es obtenido mediante el agregado de sales de amonio. Actualmente, el medio más empleado para el cultivo de *Leptospira* es el EMJH, con algunos aditivos como BSA, piruvato y suero de conejo. Este último puede ser agregado siempre y cuando provenga de un conejo seronegativo y con complemento inactivado previamente (Adler, 2015).

Dado su crecimiento lento, es probable que el cultivo de leptospiras a partir de muestras biológicas se pierda en presencia de otros microorganismos contaminantes, por lo que es común el

agregado de agentes selectivos tales como 5'-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina (Levett, 2001). El uso de filtros estériles de 0.22 μm es otra forma de disminuir la carga de contaminantes, dado que las leptospiras son capaces de atravesarlos gracias al peculiar tamaño de su cuerpo celular. Como última medida de purificación de cultivos, el pasaje por animales tales como hámsters o ratones, es también una opción.

Una vez que se obtiene un cultivo puro, las leptospiras logran desarrollar un crecimiento en fase exponencial antes de los 15 días, pero, en proceso de purificación el desarrollo de crecimiento puede llevar hasta 13 semanas.

Existen otros medios de cultivo de consistencia semisólida (agar blando), donde las leptospiras son mantenidas por más tiempo; en este tipo de medio el crecimiento se evidencia inmediatamente por debajo de la zona en contacto con el aire, formando un anillo de densidad visualmente diferenciable llamado disco de *Dinger* (Adler, 2015).

Las leptospiras pueden ser almacenadas por largos períodos en medio semisólido a temperatura ambiente, aunque pueden perder viabilidad así como también virulencia. Por el contrario, el almacenamiento en nitrógeno líquido, teniendo la precaución de agregar un criopreservante como el DMSO, es una buena opción para el mantenimiento a largo plazo sin pérdida de virulencia (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010), la cual puede restablecerse por infección experimental de un hospedero apropiado (típicamente hámster, aunque también son utilizadas otras especies de roedores como los cobayos y los gerbiles).

1.2.2 Taxonomía

Antiguamente, el género *Leptospira* era dividido en dos especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*. El primer grupo abarcaba todas las cepas patógenas, mientras que en el segundo se agrupaban las saprófitas. Ambos grupos eran divididos en numerosos serovares en base a la aglutinación luego de absorción cruzada con diferentes antígenos homólogos, mediante la técnica CAAT (Adler, 2015; Levett, 2001); que pese a su laboriosidad, sigue siendo la técnica de referencia para la determinación de serovar.

Con el desarrollo de tecnologías basadas en el estudio del ADN, como la hibridación ADN-ADN, PCR de ADNr (genes que codifican ARNs ribosomales) y obtención de genomas completos mediante tecnologías de secuenciación masiva, esta simple separación en dos especies se fue

complejizando. Actualmente se conocen 35 especies de *Leptospira* (Thibeaux, Girault, et al., 2018) (**Tabla 1**), que comprenden más de 300 serovariedades (Picardeau, 2017).

Tabla 1. Especies del género *Leptospira*.

Patógenas	Intermedias	Saprófitas
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. idonii</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. macculloughii</i>
<i>L. adleri</i>	<i>L. perolatti</i>	<i>L. brenneri</i>
<i>L. ellisii</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. harrisiae</i>
<i>L. barantonii</i>	<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. kmetyi</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. alstonii</i>	<i>L. neocaledonica</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. weilii</i>	<i>L. hartskeerlii</i>	<i>L. yanagawae</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>L. haakeii</i>	<i>L. levetti</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. saintgironsiae</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. mayottensis</i>		
<i>L. alexanderi</i>		

La clasificación a nivel de serovar está basada probablemente en la expresión de epítopes de superficie correspondientes al LPS, en función de su composición y disposición espacial de azúcares (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). A su vez, aquellos serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos, por lo que serovares diferentes pueden pertenecer al mismo serogrupo (**Tabla 2**). Si bien la clasificación a nivel de serogrupo no tiene valor taxonómico, es útil en diagnóstico, correlaciona con propiedades fenotípicas como la virulencia, y permite así una caracterización epidemiológica adecuada.

Tabla 2. Algunas serovariedades pertenecientes a *Leptospira interrogans sensu lato*, y su relación con la clasificación en serogrupos. Adaptado de (Levett, 2001).

Serogrupo	Serovar
Australis	Australis, Bratislava
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim
Ballum	Ballum, Arborea
Canicola	Canicola, Portlandvere
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai
Pomona	Pomona, Kennewicki
Sejroe	Sejroe, Hardjo

El hecho de que muchos serovares sean encontrados en más de una especie a la vez (**Tabla 3**), da una noción de que los mismos genes de biosíntesis de LPS se encuentran en cepas de distintas especies, lo que implica eventos de transferencia genética (Haake et al., 2004). Esto subyace a la noción de que la determinación de serogrupo y serovar no permite determinar la especie, por lo que es necesario abordar esta última por identificación molecular del acervo genético. En este sentido se han desarrollado una gran variedad de técnicas moleculares para la tipificación de aislamientos de *Leptospira*, que serán introducidos más adelante en esta Tesis.

Tabla 3. Ejemplos de serovares compartidos entre distintas especies. Adaptada de (Adler, 2015).

Serovar	Especie
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>

1.2.3 Patogenia

Existen diferentes tipos de interacciones entre bacterias y hospederos, en las cuales difiere el grado de beneficio y/o perjuicio de ambos. En las relaciones de mutualismo, la interacción bacteria-hospedero beneficia a ambas partes por igual, a diferencia del comensalismo, donde únicamente la bacteria resulta beneficiada, pero sin ejercer ningún efecto negativo en el hospedero; por otra parte, en las relaciones parasíticas o patogénicas, esta interacción perjudica al hospedero, alterando el estado fisiológico normal del mismo y conduciendo al desarrollo de enfermedad. El grado en el que una bacteria patógena puede causar enfermedad, depende directamente de su virulencia, que a su vez se encuentra determinada por múltiples componentes tales como proteínas, o estructuras más complejas, e incluso fenotipos, que en su conjunto se denominan factores de virulencia (Adler, 2015).

Una serie de condiciones deben ser probadas para establecer que el producto de expresión de un gen es factor de virulencia; por ejemplo, dicho gen debe estar asociado a cepas que producen enfermedad, pero no a las que no la producen, y la mutación/inactivación del gen debe disminuir o incluso atenuar completamente la virulencia de la bacteria, así como la complementación con dicho gen, restituirla (postulados moleculares de Koch) (Picardeau, 2017). En especies patógenas de *Leptospira* se han propuesto varios factores de virulencia (Murray, 2015), entre los que se destacan una variedad de proteínas de superficie que posiblemente median en la interacción patógeno-hospedero; el LPS, al igual que en bacterias Gram-negativas, como molécula de superficie vinculada a toxicidad; y el aparato flagelar funcional (Adler, 2014; Ko et al., 2009; Wunder Jr et al., 2016). No obstante, las bases celulares y moleculares de la patogénesis en *Leptospira* no están aún comprendidas (Adler, 2014): al no compartir factores de virulencia clásicos presentes en otras bacterias patógenas, ni presentar islas de patogenicidad identificables en sus genomas, es probable que posea mecanismos de patogenicidad propios y novedosos. Ello es también consistente con la sobrerrepresentación de genes que codifican para proteínas de función desconocida (Adler, 2015).

1.2.3.1 Lipopolisacárido

El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa en *Leptospira*, y el principal antígeno contra el cual la inmunidad humoral desarrolla una respuesta durante la infección (Bulach et al., 2000). Otras espiroquetas de importancia médica como *Borrelia burgdorferi* (agente causal de la enfermedad de Lyme) y *Treponema pallidum* (agente de la sífilis), no expresan LPS (Adler, 2015).

El LPS (**Figura 4**) está formado por tres componentes, unidos covalentemente entre sí: el lípid A, constituido por carbohidratos y ácidos grasos conservados, es la parte hidrofóbica anclada en la membrana externa, y con propiedades endotóxicas; el antígeno O, que se extiende desde la superficie de la célula al medio extracelular, y está formado por oligosacáridos lineales y ramificados de longitud y composición variable; y el oligosacárido central, un núcleo de carbohidratos conservados que une el antígeno O al lípido A.

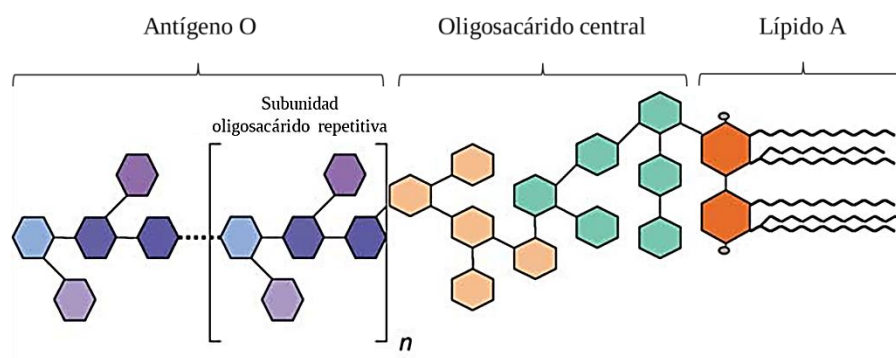


Figura 4. Estructura general del LPS en bacterias Gram-negativas. La composición del antígeno O es altamente variable, y blanco primario en respuestas de anticuerpos contra LPS. El oligosacárido central está compuesto frecuentemente por azúcares comunes tales como hexosas y hexosaminas (beige), y por otros azúcares más inusuales como el ácido 2-keto-3-deoxioctulosanato ó KDO y heptosas (verde). El lípido A presenta un esqueleto de diglucosamina altamente conservado; la longitud de las cadenas acilo, así como su patrón de sustitución, son los determinantes primarios de la toxicidad del lípido A. Adaptado de (Erridge, Bennett-Guerrero, & Poxton, 2002).

La estructura del lípido A en *Leptospira* es algo distinta respecto a bacterias Gram-negativas en general, en particular por poseer un metilo modificando al grupo 1-fosfato, algo no visto en ninguna otra estructura de lípido A (Que-Gewirth et al., 2004), también con presencia de ácidos grasos insaturados, infrecuentes de ver, en dos de las cadenas acilo secundarias. Hay evidencias de que la variabilidad de serovares en *Leptospira* está sustentada principalmente en diferencias en la estructura química del LPS (Bulach, 2000; Patra et al., 2015), particularmente debido a la alta variabilidad de su componente carbohidrato en el antígeno O (Picardeau, 2017). Y ya se había mapeado en el locus *rfb* del genoma de *Leptospira* (Mitchison et al., 1997), un conjunto de genes codificando proteínas importantes para la síntesis de los azúcares del antígeno O (Bulach, 2000). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la estructura química detallada del LPS de *Leptospira* (Patra et al., 2015; Que-Gewirth et al., 2004), por lo que no hay certeza de que todas las proteínas relevantes para su biosíntesis estén codificadas por genes del locus *rfb*.

La expresión del LPS es esencial para la sobrevivencia de *Leptospira* tanto dentro como fuera del hospedero, jugando un rol esencial en la patogénesis de la colonización y diseminación en modelos animales. Las interrupciones con transposición de dos genes en el locus *rfb*, condujeron a una significativa atenuación de la virulencia, y rápida eliminación de las cepas mutantes, en experimentos de infección experimental en animales susceptibles (Murray et al., 2010). Si bien en cada caso el transposón interrumpió la expresión de un solo gen, no se pueden descartar efectos polares en la transcripción de genes 3' río abajo. Teniendo esa precaución en mente para interpretar los resultados, el LPS no mostró cambios detectables en su tamaño molecular, sugiriendo fuertemente una modificación mínima de su estructura. La disminución de su reactividad como antígeno frente a antiseros serovar salvaje-específicos, fue sin embargo sustancial por MAT (Murray et al., 2010).

El análisis genómico del locus *rfb* indica que codifica fundamentalmente enzimas esenciales para la síntesis del antígeno O, como en muchas bacterias Gram-negativas. El primer locus *rfb* en ser parcialmente caracterizado fue el de *L. interrogans* serovar Copenhageni (Mitchison et al., 1997); este trabajo marcó un hito, ya que se logró describir la biosíntesis de dTDP-ramnosa, principal componente del antígeno O, constituyendo así el primer estudio a nivel molecular de genes implicados en la biosíntesis de LPS en espiroquetas.

Existen diferencias marcadas en cuanto a organización y composición génica del locus *rfb* entre especies con patogenicidad diferencial (**Figura 5**). El análisis genómico de 20 especies de *Leptospira* permitió determinar la localización de los clústeres de genes de biosíntesis del antígeno O en ubicaciones genómicas diferentes, siendo su tamaño variable, desde 3.768 pb para *L. wolffii* serovar Khorat, hasta 121.402 pb para *L. alexanderi* serovar Manhao3. El inicio y fin del locus está definido por los genes *marR* y *DASS*, respectivamente, en todas las especies patógenas, y en tres especies de patogenicidad intermedia: *L. fainei*, *L. broomii* y *L. inadai*. En las saprófitas, si bien *L. vanthielii*, *L. wolbachii* y *L. yanagawae* presentan al inicio del locus el gen *marR*, el resto de las especies en este grupo no lo presentan, y en ningún caso se encontró el gen *DASS*. En términos generales, y no considerando el caso extremo de *L. wolffii* serovar Khorat en la cual el locus *rfb* únicamente está compuesto por cuatro genes (codificantes principalmente para transferasas), este locus presenta un amplio repertorio génico que codifica para proteínas tales como aminotransferasas, enzimas de clivaje, flipasas, glicosiltransferasas, lipoproteínas, metiltransferasas, proteínas involucradas en la extensión del antígeno O, sensores y reguladores, entre otros (Fouts et al., 2016). Análisis comparativos realizados en dicho locus para *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa

Fiocruz L1-130, perteneciente al grupo de las patógenas, y *L. licerasiae* serovar Varillal cepa VAR 10, de patogenicidad intermedia, evidencian disparidades a nivel del perfil de azúcares (Patra et al., 2015); además, la diferencia observada en el número de genes constituyentes para cada especie, 91 para *L. interrogans* y únicamente 6 para *L. licerasiae*, podría explicar diferencias en la virulencia (Ricaldi et al., 2012).

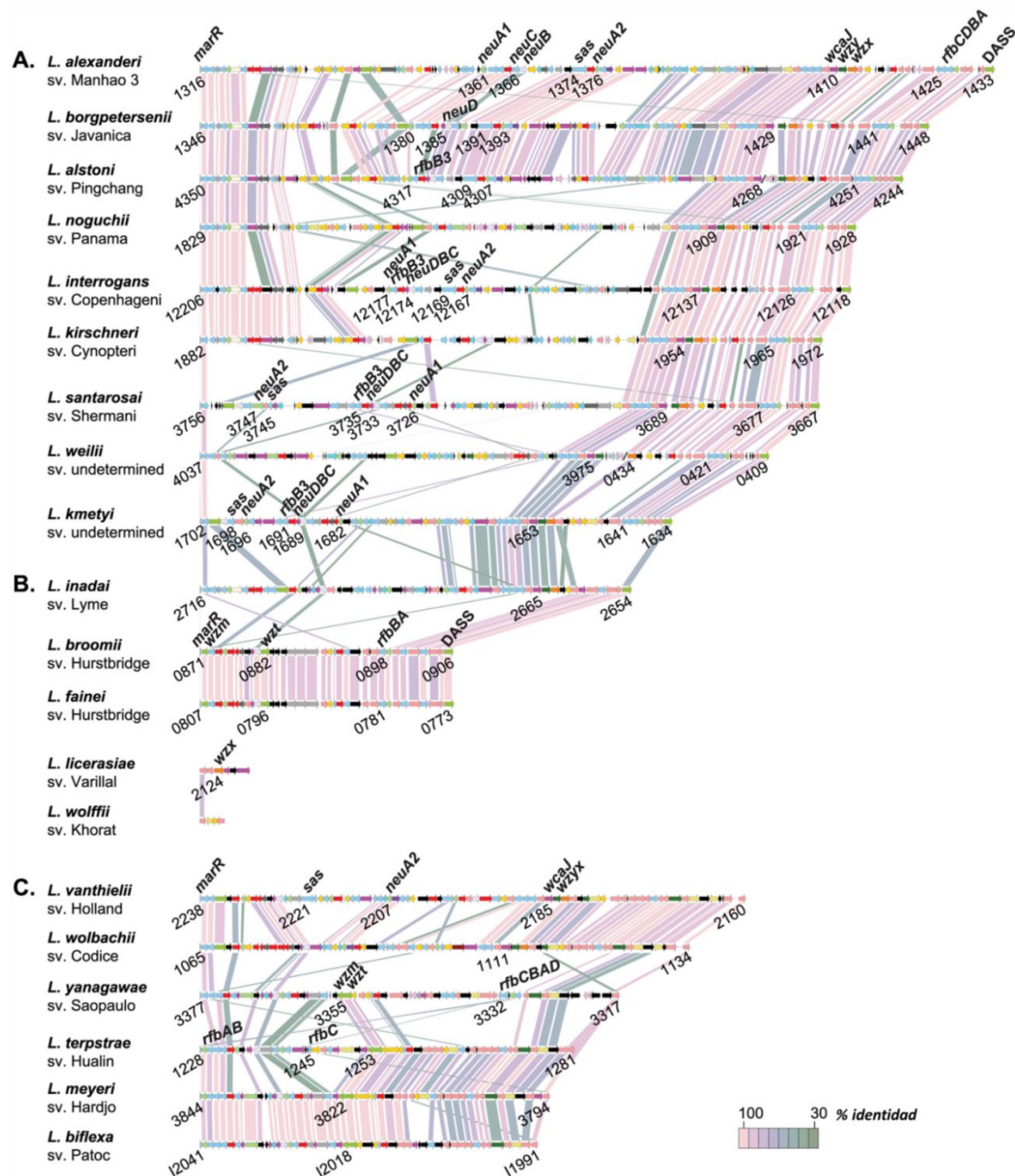


Figura 5. Estructura del locus *rfb* en *Leptospira*. Este locus contiene enzimas necesarias para la síntesis del O-antígeno del LPS: transferasas, oxidoreductasas, transportadores, entre otros. La comparación de este locus entre especies patógenas (A), intermedias (B), y saprófitas (C), permite evidenciar diferencias a nivel de composición y organización génica. A su vez, se puede observar cómo la identidad de los genes presentes en el locus varía de una especie a otra, dentro del mismo grupo. Adaptada de (Fouts et al., 2016).

A diferencia del LPS de bacterias Gram-negativas, que activan macrófagos a través de receptores TLR-4, el LPS de *Leptospira* lo hace mediante interacción con receptores TLR-2, llevando a la activación de la inmunidad innata del organismo hospedero (Werts et al., 2001). Las respuestas inmunes anti-LPS, es decir con generación de anticuerpos específicos, son la base de la inmunidad esterilizante provocada por vacunas a células enteras. Si bien las especies patógenas de *Leptospira* resisten la acción del sistema del complemento, son rápidamente eliminadas ante una respuesta de anticuerpos. Dicho esto, es esperable que exista una presión selectiva que conduzca a cambios genéticos, permitiendo a la bacteria generar variación de la expresión del antígeno O como mecanismo de escape (Haake & Zückert, 2015). Apoyando la hipótesis de que el LPS está asociado con diferencias de virulencia y mecanismos de patogenicidad, también se ha reportado diferencia en la cantidad de antígeno O (quizás incluso de LPS completo, aunque esto no se demostró directamente) comparando una misma cepa patógena con serovar definido (Copenhageni), pero en situaciones diferentes como infección crónica en rata, enfermedad aguda en cobayo y cultivo de las bacterias *in vitro* (Nally, 2005). La cantidad de antígeno O del LPS específico de este serovar, está sustancialmente reducido en el modelo de enfermedad aguda diseminada (**Figura 6**), en comparación con niveles altos del antígeno en bacterias de cultivo o bien, interesantemente, también en bacterias aisladas de túbulo renal de las ratas (en las que no hay diseminación en riñón u otros órganos).

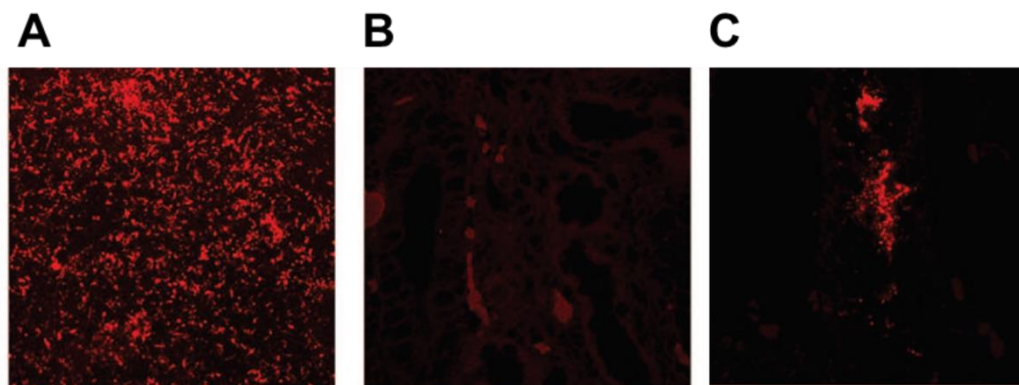


Figura 6. Niveles de expresión de antígeno O. Mediante ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para el antígeno O, se pudo determinar la expresión del mismo en condiciones de cultivo (A), infección aguda (riñón de cobayo (B); e infección crónica (riñón de rata) (C). Adaptado de (Nally, 2005).

1.2.3.2 Proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa (OMPs) cumplen múltiples funciones de relevancia para la célula bacteriana entre las que se destacan: mantenimiento de la estructura celular, interacción con sustratos específicos en el organismo hospedero, importación de nutrientes y exportación de agentes tóxicos.

Debido a su ubicación estratégica constituyen el primer punto de contacto con el hospedero, sirviendo de anclaje a las células del mismo, y siendo blanco de la actividad de anticuerpos (Pinne & Haake, 2009); estas interacciones pueden ser utilizadas para evadir la respuesta inmune o adherirse a tejidos, contribuyendo al desarrollo de la patogénesis.

La identificación de estas proteínas antigénicas expresadas durante la infección tiene una implicancia importante para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y para la producción de vacunas.

1.2.3.2.1 Familia Lig

Dentro de la familia de proteínas similares a inmunoglobulinas, Lig, se encuentran LigA, LigB y LigC (Matsunaga et al., 2003), codificadas por los genes *ligA*, *ligB* y *ligC*, respectivamente. Presentan gran similitud con proteínas de adhesión tales como la intimina de *Escherichia coli* y la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*, y son encontradas en las especies patógenas de *Leptospira* (Haake & Zückert, 2015).

El gen *ligA* se encuentra en varias especies patógenas importantes como *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. santarosai*, aunque probablemente no en todos los serovares, y definitivamente no en todas las especies patógenas conocidas (Murray, 2015). En cambio, *ligB* está distribuido en todas las especies patógenas de *Leptospira*. En el caso de *ligC*, si bien también está presente en leptospiras patógenas, en muchas cepas se encuentra como pseudogen y en otras simplemente está ausente (Haake & Zückert, 2015).

Eventos de recombinación en los tres genes han sido asociados a la evasión del sistema inmune del hospedero, así como también a la alteración en las propiedades de unión a diferentes sustratos. Uno de los mecanismos encontrados es mediante rearrreglos en mosaico (Mcbride et al., 2009); este mecanismo puede conferir ventajas de sobrevivencia ante la presión antigénica, y ha sido reportado en otras bacterias como mecanismo de escape a la inmunidad así como en generación o

variación de la virulencia (Hollingshead et al., 2000; Mustapha et al., 2016; Santos-Júnior et al., 2016). Sin embargo, la recombinación en mosaico en OMPs de *Leptospira* no es común, siendo el de *ompL1* (Haake et al., 2004) el único caso comprobado hasta el momento. Otro mecanismo es la variación en número de repetidos en tándem. Las proteínas LigA-C poseen un número variable de dominios de tipo inmunoglobulina sucesivos (típicamente entre 12 y 13), cuya variación en número también puede significar la evasión del sistema inmune, dado que distintos dominios individuales tienen variación importante de secuencia y ofrecen epítopes diferenciales. Este mecanismo sólo ha sido manifestado en LigA (Palaniappan et al., 2005), blanco proteico de gran interés pues es uno de los que ha dado mejores resultados como antígeno individual en vacunas recombinantes (Evangelista, Lourdault, Matsunaga, & Haake, 2017).

LigB se encuentra expuesta en la superficie, mientras que LigA es además liberada al medio extracelular (Matsunaga et al., 2005). La sobreexpresión de estas proteínas al inicio de la infección, incrementan la adherencia de las bacterias a diferentes proteínas de matriz extracelular tales como fibronectina, fibrinógeno, y colágeno I y IV (Haake & Zückert, 2015). Mediante expresión heteróloga de LigB en la especie saprófita *L. biflexa*, se demostró que esta proteína a su vez interacciona con componentes del sistema complemento del hospedero y proteínas reguladoras de dicho sistema, modulando la respuesta inmune y provocando un aumento en la sobrevivencia de las bacterias mutantes cuando se las enfrentó a suero humano (Choy et al., 2012).

Además de ser encontradas únicamente en especies patógenas, y de su posición en la membrana, otro componente que influye en su consideración como factores de virulencia es que tanto LigA como LigB son detectadas en cepas virulentas pero no en cepas atenuadas mediante sucesivos pasajes en cultivo, por lo que la pérdida de su expresión se correlaciona directamente con la pérdida de virulencia (Matsunaga et al., 2003).

1.2.3.2.2 LipL32

LipL32 es la proteína de membrana más abundante en especies patógenas de *Leptospira*, con aproximadamente 40.000 copias por célula (Malmström et al., 2009). Su localización en membrana externa fue demostrada por fraccionamiento con Tritón X-114 (Haake et al., 2000); aunque estudios posteriores demostraron que no está expuesta hacia la superficie, sino que se encuentra en la mitad periplasmática de la OM (Pinne et al., 2013), ya que el tratamiento con proteinasa K no cliva LipL32 en leptospiras intactas, pero sí la digiere cuando las bacterias son lisadas previamente.

Dado que LipL32 constituye un 75% de la membrana externa, es tentador postular un rol estructural de estabilización de la membrana. No obstante, la ausencia de esta proteína se acompaña con crecimiento de bacterias morfológicamente normales, sin alteración estructural detectable (Murray, Srikrum, Hoke, et al., 2009). En este mismo trabajo se observó que la cepa mutante carente de LipL32, fue capaz de unir componentes de la matriz extracelular en la misma medida que la cepa salvaje, así como también fue capaz de desarrollar infección aguda y crónica en los modelos empleados. Tampoco se vio afectada su viabilidad en cultivo, por lo que no sería necesaria para la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente.

Pese a que su ausencia no parece afectar el desarrollo de la infección, estudios realizados con microarreglos de proteínas mostraron que LipL32, junto con proteínas de la familia Lig, fueron los antígenos más reactivos tanto en sueros de pacientes con enfermedad aguda, así como en pacientes en fase de convalecencia (Lessa-Aquino et al., 2013). Por otra parte, su expresión durante infección aguda también se ha evidenciado en modelos animales (Haake et al., 2000); mediante tinción por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos para LipL32 fue posible ver leptospiras colonizando el túbulo renal proximal (**Figura 7**).

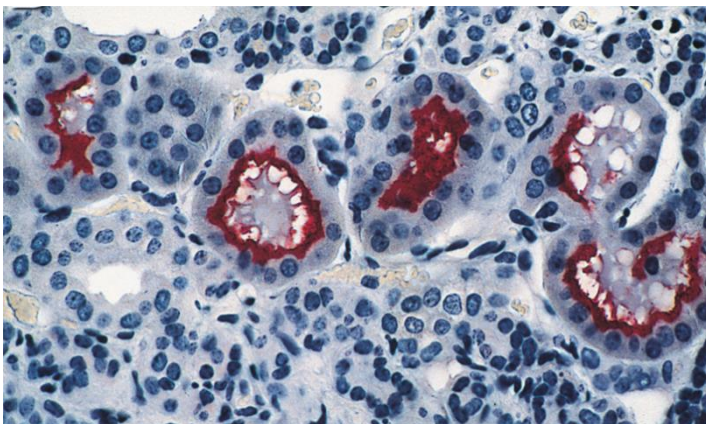


Figura 7 Inmunohistoquímica a partir de tejido renal de hámster infectado con *L. kirschneri*. En la figura se muestra la colonización (en rojo) a nivel de los túbulos renales proximales, 28 días post-infección. Como anticuerpo primario se utilizó un policlonal contra LipL32 desnaturalizada de *L. kirschneri* (antisuero de conejo). Adaptado de (Haake et al., 2000).

Si bien su participación en el desarrollo de la infección no es clara, se ha comprobado su interacción con el receptor TLR-2, estimulando la respuesta inflamatoria en modelos de células HK-2 –línea celular inmortalizada de túbulo proximal derivada del riñón humano normal (Lo et al., 2013), HEK-293 –células embrionarias de riñón humano (Yang et al., 2006) y en modelos de *zebrafish* (Chang et al., 2016).

El hecho de que LipL32 esté conservada en todas las especies patógenas, así como su abundancia en la membrana, hacen pensar en ella como un factor de virulencia. Sin embargo,

intrigantemente, se ha demostrado que no es así. Quizás otro(s) factor(es) suplen su ausencia en los modelos experimentales de delección, por redundancia funcional y genética (Adler, 2015).

1.2.3.2.3 Loa22

Loa22 constituye la segunda proteína más abundante en la membrana externa de *Leptospira* (Malmström et al., 2009). En su extremo C-terminal presenta un dominio OmpA mediante el cual se encuentra anclada al peptidoglicano; a su vez, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante ensayos de inmunoprecipitación y digestión con proteinasa K, también se encuentra expuesta en la superficie aunque en menor medida (Koizumi et al., 2003).

Dada su abundancia en la membrana, se cree que Loa22 puede estar jugando un rol en el mantenimiento de la estructura de la superficie bacteriana (Koizumi et al., 2003), estableciendo un enlace físico entre la membrana externa y el peptidoglicano a través del dominio OmpA. Pero aun hoy no se conoce alguna función biológica demostrada de Loa22. Sí se sabe que es esencial para la virulencia en modelos *in vivo*: la disrupción de su expresión impide el establecimiento de la infección en modelos agudos de la enfermedad como el hámster y el cobayo, aun cuando se evidencian bacteriemia y colonización renal (Ristow et al., 2007). Durante la infección aguda de cobayos se ve un aumento significativo en la expresión de Loa22 en el hígado, en relación a otras OMPs y en comparación a la expresión en condiciones *in vitro* (Nally et al., 2007). Junto al aparato de natación flagelar (Wunder Jr et al., 2016), la hemo oxigenasa HemO (Murray, Srikram, Henry, et al., 2009), el LPS y no más de una docena de otras moléculas definidas de *Leptospira*, Loa22 se encuentra entre los pocos factores de virulencia demostrados en forma experimental (Murray, 2015), y cumpliendo con los postulados de Koch a nivel molecular (Picardeau, 2017).

Loa22 no es exclusiva de especies patógenas. En *L. biflexa* se encuentra un gen ortólogo, que codifica para una proteína 56% idéntica; esto podría estar indicando algún otro tipo de funcionalidad, e incluso reforzando su rol estructural. El hecho de que una proteína esencial para la virulencia esté presente tanto en especies patógenas como en saprófitas indica que la sola presencia en las primeras no debe tomarse como indicativo de factor de virulencia (Haake & Zückert, 2015).

1.3 Aplicación de la biología molecular en el estudio de *Leptospira*

En los últimos años, la biología molecular aplicada como herramienta para el diagnóstico y tipificación de microorganismos de interés sanitario, ha ido complementando las técnicas tradicionalmente utilizadas.

Además de la evaluación clínica, la leptospirosis es principalmente diagnosticada a través métodos serológicos, siendo el MAT la técnica de referencia (Musso & Lascola, 2013; OIE, 2004; Picardeau, 2013). Como se mencionase previamente, este método presenta inconvenientes en cuanto a sensibilidad y especificidad, no permitiendo diferenciar entre anticuerpos naturales y aquellos provenientes de vacunación, ni asignar el serovar infectivo. Para este último propósito resulta imperioso lograr aislar la bacteria mediante cultivo microbiológico y a partir del aislamiento se emplea otra técnica serológica, CAAT, que es el método de referencia en la determinación de serovar (Adler, 2015; Levett, 2001); sin embargo, su elevado costo y laboriosidad, hacen que muy pocos laboratorios en el mundo lo realicen. Teniendo en cuenta este escenario, el desarrollo de estrategias de biología molecular que faciliten las tareas de diagnóstico y tipificación resultan sumamente necesarios.

1.3.1 Diagnóstico por PCR

Históricamente, los laboratorios de diagnóstico microbiológico emplean pruebas bioquímicas o serológicas para la identificación/caracterización fenotípica del agente infeccioso. Estas técnicas pueden sin embargo no ser muy eficientes, ya que suelen ser laboriosas y en determinados casos están sujetas a subjetividad (como por ejemplo, en la lectura de datos de seroaglutinación). Con el advenimiento de tecnologías asociadas a la detección de ADN, el diagnóstico molecular ha sido cada vez más utilizado, redundando en una identificación más rápida del agente infeccioso, altamente sensible y específica, y además fácilmente estandarizable. Pese a esta tendencia en aumento, la leptospirosis continúa siendo diagnosticada principalmente mediante métodos serológicos. En Uruguay, el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, a cargo del diagnóstico de leptospirosis animal, realiza la detección del agente únicamente mediante MAT, con las dificultades a las que esto conlleva.

La gran sensibilidad y especificidad que presenta la técnica de PCR, sumado a las ventajas que poseen variantes de la misma, como la PCR en tiempo real (con la cual, además de la detección del microorganismo, es posible cuantificar el inóculo inicial en la muestra analizada), hacen que la

técnica sea sumamente útil a los fines diagnósticos. Sin embargo, y a pesar de disponer de un gran número de protocolos para la amplificación de marcadores genéticos específicos de especies patógenas de *Leptospira*, son muy pocos los que han sido validados con ADN proveniente de muestras biológicas (Ahmed et al., 2012; Ahmed et al., 2009; Bourhy et al., 2011b; Kurilung et al., 2017; Pakoa et al., 2018; Riediger et al., 2017.; Slack et al., 2007; Villanueva et al., 2016; Villumsen et al., 2012).

Es pertinente señalar que la detección de genes marcadores actualmente es confirmatoria de la presencia de leptospiras patógenas, pero sigue sin ser informativa acerca del serovar infectivo. En virtud de ello, se han desarrollado otras técnicas basadas en amplificación y secuenciación de ADN, o sólo amplificación del mismo, que permiten llevar a cabo una caracterización más exhaustiva.

1.3.2 Identificación y tipificación molecular de *Leptospira* spp.

Desde el punto de vista epidemiológico, la tipificación constituye una herramienta muy importante permitiendo dar identidad a la cepa infectante en un hospedero dado, y consecuentemente haciendo posible un apropiado desarrollo de estrategias preventivas y/o de control.

La caracterización completa del agente requiere de su cultivo y aislamiento a partir de muestras clínicas, sobre el cual se aplicarán los métodos disponibles para tipificación. Para *Leptospira*, además del uso del MAT como método de identificación a nivel de serogrupo, la tipificación genotípica se hace imprescindible en la determinación de especie y serovar. Métodos como electroforesis en campo pulsado, PFGE, o distintos abordajes basados en amplificación por PCR, han sido empleados en la tipificación de *Leptospira* (Cerqueira et al., 2009), algunos de los cuales se describirán brevemente a continuación.

1.3.2.1 Determinación de especie mediante amplificación y secuenciación del gen *rrs*

La identificación de especie y determinación de relaciones filogenéticas por medio de la secuencia de ARNr o de los genes ADN_r que lo codifican, es ampliamente utilizada dadas las características de este marcador genético (Woese et al., 1977).

La amplificación y secuenciación parcial del gen *rrs* (ADN_r 16S) en *Leptospira* con oligonucleótidos específicos, es una metodología ampliamente utilizada que permite la identificación de las especies constituyentes del género, tanto a partir de muestras de ADN extraídas de cultivos

puros, como de muestras biológicas (Mérien et al., 1992), pudiendo diferenciar fácilmente otras bacterias espiroquetas como *Borrelia* y *Treponema*.

Mediante la secuenciación del producto obtenido es posible además realizar análisis de filogenia y evaluar la distribución de especies circulantes en una región dada. No obstante, esta aproximación no permite determinar el serogrupo/serovar infectivo, por lo que es necesario complementar este enfoque con otras técnicas de tipificación.

1.3.2.2 Tipificación mediante amplificación de alelos MLVA

El análisis de múltiples locus de repetidos en tándem (MLVA), es utilizado en la tipificación molecular de diferentes microorganismos, y se basa en la variación del número de secuencias de ADN repetidas en tándem (VNTRs), en diferentes loci seleccionados del genoma bacteriano.

La tipificación a nivel de serovar mediante el uso de diferentes alelos VNTR fue desarrollada y validada para variedades pertenecientes a las especies *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* y *L. kirschneri* (Salaün et al., 2006), y posteriormente también adaptada a cepas de la especie *L. santarosai* mediante amplificación de otros loci (Hamond et al., 2015).

Los alelos más ampliamente utilizados en la tipificación de *L. interrogans* y *L. kirschneri* son VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10, mientras que para *L. borgpetersenii* se emplean los alelos VNTR-10, VNTR-Lb4 y VNTR-Lb5 (Salaün et al., 2006). En combinación, dichos alelos presentan gran poder discriminatorio. Así, la determinación del perfil VNTR utilizado en combinación con otros métodos de tipificación que permitan identificar la especie y el serogrupo, hace posible diferenciar distintos serovares dentro de estas especies.

Cabe mencionar que los serovares asignados mediante esta combinación de métodos deben ser informados como presuntivos, ya que no constituye el método de referencia aceptado para la identificación de los mismos, que es el test de absorción y aglutinación cruzada CAAT, mencionado anteriormente. La determinación de serovar mediante CAAT implica el uso de un panel de sueros inmunes de conejo o anticuerpos monoconales específicos y representativos de todos los serovares conocidos, los cuales están disponibles en contados laboratorios de referencia en el mundo (Adler, 2015).

1.3.2.3 Genotipificación por medio de MLST

La tipificación basada en la secuencia de múltiples loci (MLST) consiste en la amplificación y secuenciación parcial de varios genes que codifican para proteínas constitutivas (“housekeeping”), y es muy utilizada en la caracterización de múltiples microorganismos (Cerqueira et al., 2009). Dada una secuencia única para cada uno de estos genes, se le asigna un número de alelo y cada combinación específica de todos ellos, da lugar a un perfil alélico único conocido como secuenciotipo o ST.

Su aplicación en la tipificación de *Leptospira* ha llevado al desarrollo de varios esquemas MLST incluyendo diferentes genes seleccionados. En la actualidad los más ampliamente utilizados son los que figuran en la base de datos del Pub-MLST (<https://pubmlst.org/leptospira/>) y que se componen por los genes: *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB* y *caiB* (Boonsilp et al., 2013); *adk*, *glmU*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *mreA* y *pntA* (Varni et al., 2014); o bien, *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs2* y *secY* (N. Ahmed et al., 2006). Dentro de este último esquema se encuentra el gen *secY* que codifica para la subunidad SecY del canal de translocación proteica SecYEG, y que ha sido ampliamente utilizado en la tipificación de cepas de *Leptospira* (Bourhy et al., 2013; Hamond et al., 2016; Perez et al., 2010). Análisis filogenéticos realizados en base a la secuencia de *secY* han logrado reproducir resultados obtenidos por MLST con un esquema completo de 7 genes, lo que demuestra su gran capacidad discriminatoria (Perez et al., 2010).

La sencillez de esta técnica, y sus pocos requerimientos en cuanto a cantidad de ADN, hacen que pueda ser usada como técnica de rutina en la tipificación de *Leptospira* spp. generando resultados confiables y reproducibles, que pueden ser fácilmente comparados con los obtenidos por otros laboratorios (Cerqueira et al., 2009).

1.4 Genómica de *Leptospira*

1.4.1 Organización del genoma y características generales

Los primeros genomas de *Leptospira* spp. en ser secuenciados fueron los de *L. interrogans* serovar Lai (Ren et al., 2003) y *L. interrogans* serovar Copenhageni (Nascimento et al., 2004), representativos del serogrupo Icterohaemorrhagiae. Ambos genomas presentan un 95% de identidad a nivel nucleotídico (Nascimento et al., 2004), y están compuestos por dos cromosomas circulares: uno de aproximadamente 4000 kb (CI) y otro más pequeño de 350 kb (CII) (**Figura 8**).

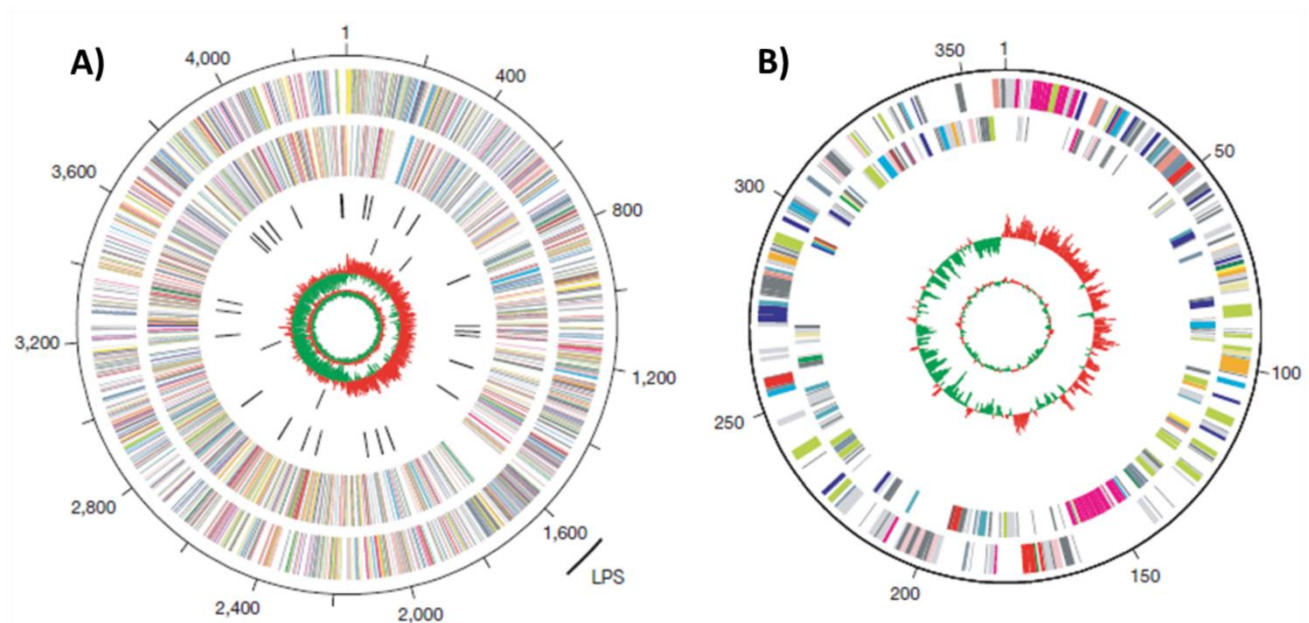


Figura 8. Representación gráfica del genoma de *Leptospira interrogans* serovar Lai. La secuenciación del genoma completo de esta cepa permitió establecer la existencia de un cromosoma de mayor tamaño, CI (A), y otro más pequeño, CII (B). La escala que se ubica alrededor de cada cromosoma se encuentra en kilobases (kb). Genes de igual color, codifican para proteínas de igual función (Ren et al., 2003).

En los años subsiguientes, la secuenciación de genomas completos fue en aumento, y a los genomas de *L. interrogans* inicialmente secuenciados, se les sumaron los de la especie saprófita *L. biflexa* (Picardeau et al., 2008), especies intermedias (Puche et al., 2018; Ricaldi et al., 2012), y otras especies patógenas (Bulach et al., 2006; Chou et al., 2012; Cosate et al., 2015; Jorge et al., 2018; Moreno et al., 2016; Nally et al., 2016).

El acceso a genomas completos permitió realizar estudios comparativos, donde por ejemplo, se determinó que el tamaño del cromosoma mayor (CI) de *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* oscila entre 3.9 y 4.6 Mb, así como también varía el contenido en G+C fluctuando entre

35 y 41% (Picardeau et al., 2008). A su vez, en el genoma de *L. biflexa* se evidenció la presencia de un tercer replicón de 74 kb (p74), en el cual se encontraron genes que presentan ortólogos en el cromosoma CI de las especies patógenas. El análisis total de secuencias codificantes reveló alrededor de un 40% de genes compartidos por las tres especies (**Figura 9**), así como también dejó de manifiesto la presencia de un mayor número de genes involucrados en procesos de transducción de señales y de adquisición de nutrientes en *L. biflexa*, lo que coherente con su capacidad de adaptación a condiciones de vida libre y su alta tasa de crecimiento (Picardeau et al., 2008).

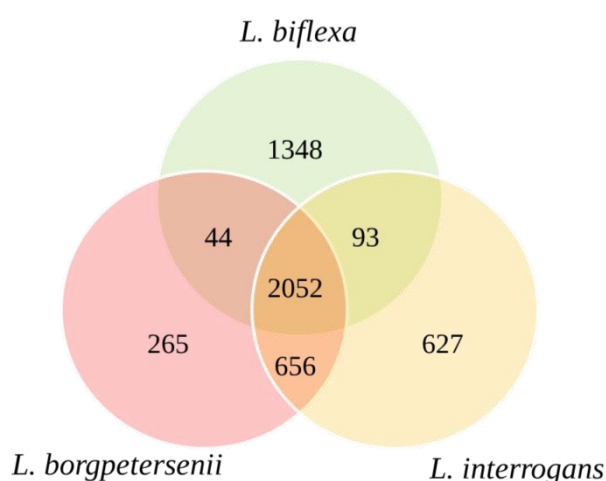


Figura 9. Número de genes compartidos entre *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*. Adaptado de (Picardeau et al., 2008).

Si bien en el CI se encuentra la mayoría de los genes, muchos de los cuales codifican para funciones de mantenimiento (“housekeeping”), el CII también posee genes esenciales; un claro ejemplo de ello es el hecho de que en *L. interrogans* todos los genes codificantes para las enzimas responsables de la biosíntesis del hemo, un factor esencial para el crecimiento de la bacteria, se encuentren en el CII (Guégan et al., 2004). Por su parte, el CIII o p74 presente en *L. biflexa*, no ha sido encontrado en ninguna otra especie.

El pangenoma a nivel de género, se define como el conjunto de genes presentes en todas las especies del mismo, y se puede dividir en un genoma núcleo (subconjunto de genes compartidos por todas las especies), y un genoma accesorio (genes presentes en una o más especies, pero no en todas). El análisis del pangenoma de *Leptospira*, incluyendo datos correspondientes a distintas cepas de las especies reportadas hasta 2017 (240 genomas de acceso público), permite estimar 85645 genes ortólogos. El agregado de genomas más recientemente identificados, como los de *L. venezuelensis* (Puche et al., 2018), y los de 12 especies nuevas de reciente clasificación (Thibeaux et al., 2018b),

incrementó este número a 89868 (**Figura 10**) (Thibeaux et al., 2018a). La caracterización de estas nuevas especies ajustó también el porcentaje de G+C a cifras levemente mayores con las reportadas previamente (Picardeau et al., 2008), ya que algunas de las especies identificadas ronda el 48% (Thibeaux et al., 2018b).

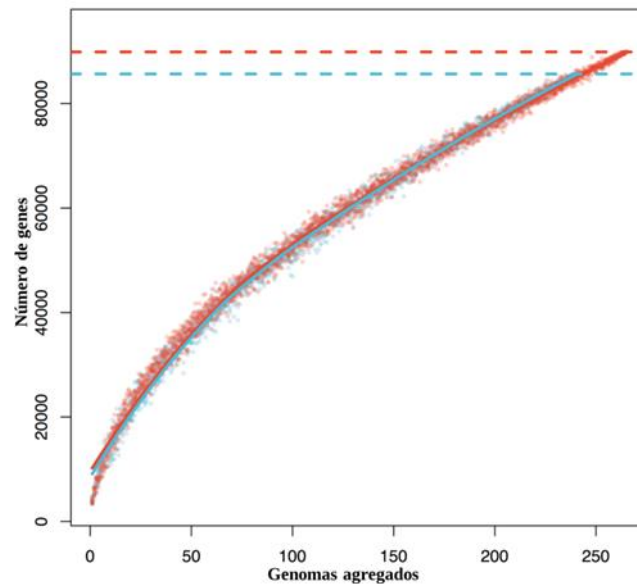


Figura 10. Estimación del pangenoma de *Leptospira*. En azul se muestra la abundancia acumulativa de genes considerando 240 genomas de *Leptospira* spp. reportados hasta 2017, mientras que en rojo es dicha abundancia teniendo en cuenta los genomas nuevos. Adaptado de (Thibeaux et al., 2018a).

La comparación de genomas también ha permitido determinar diferencias entre especies patógenas y saprófitas; en el locus *rfb*, por ejemplo, se advierte en general una complejidad mayor en las primeras, observándose patrones de rearrreglos distintos incluso dentro del mismo grupo, tal y como se mostró en la **Figura 5**. En el grupo de las patógenas, estos cambios en la organización génica posiblemente expliquen distintas interacciones con el hospedero, así como mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Fouts et al., 2016). Contrariamente, el genoma de *L. biflexa* parece ser más estable, posiblemente debido a su gran densidad génica, que contribuye a mantener un ordenamiento en los genes (Picardeau et al., 2008).

Otro hallazgo importante es la presencia de sistemas CRISPR/Cas únicamente en especies patógenas. Este sistema constituye un mecanismo de defensa para procariontes, y se ha visto asociación directa de estos sistemas con evasión de respuesta inmune a través del apagado de vías de señalización, así como su rol en el mantenimiento de la virulencia en otras bacterias (Sampson et al., 2013).

Muchos otros determinantes genéticos han sido encontrados exclusivamente en especies patógenas de *Leptospira*, transformándose en potenciales factores de virulencia. No obstante, la mayoría de ellos no presenta una función conocida y no tienen homología a otros factores de virulencia “clásicos” reportados en muchas otras bacterias patógenas (Ko et al., 2009), con lo que probablemente se precisarán verificaciones experimentales para su caracterización.

La obtención de la secuencia de genomas completos permite luego realizar potentes aproximaciones de genómica comparativa, en muchos casos revelando las bases de mecanismos biológicos diversos. Indagar en la secuencia de un genoma también es muy útil para desarrollar métodos moleculares diagnósticos y/o de tipificación. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los genomas de *Leptospira* disponibles actualmente se encuentran en forma de “borrador”: dichos genomas no se encuentran cerrados (es decir, con una secuencia única y continua representativa del genoma completo), sino que son sucesiones de secuencias (*contigs*) donde no hay una continuidad del genoma, presentando espacios dónde muchas veces, debido al método de secuenciación se pierde información relevante, por ejemplo, para la comprensión de mecanismos de patogénesis.

En los últimos años, los avances experimentados en las plataformas de secuenciación han conducido al desarrollo de tecnologías de nueva generación (NGS), logrando secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela (**Tabla 4**), y permitiendo detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento.

Tabla 4. Comparativa entre diferentes plataformas de secuenciación. La longitud expresada como suma de dos valores corresponde al tamaño obtenido a partir de la secuenciación desde ambos extremos del ADN. Adaptada de (Glenn, 2011).

Plataforma	Tiempo de secuenciación	Lecturas obtenidas (<i>reads</i>) en millones	Longitud promedio de <i>reads</i> generados (pb)
<i>3730xl (capilares, no NGS)</i>	2 horas	0,000096	650
<i>Ion Torrent (chip 314)</i>	2 horas	0,10	100
<i>454 GS Jr. Titanium</i>	10 horas	0,10	400
<i>PacBio RS</i>	0,5 – 2 horas	0,01	860–1.100
<i>454 FLX Titanium</i>	10 horas	1	400
<i>Ion Torrent (chip 316)</i>	2 horas	1	>100
<i>Ion Torrent (chip 318)</i>	2 horas	4-8	>100
<i>Illumina MiSeq</i>	26 horas	3,4	150+150
<i>Illumina iScanSQ</i>	8 días	250	100+100
<i>Illumina GAIIx</i>	14 días	320	150+150
<i>SOLiD – 4</i>	12 días	>840	50+35
<i>Illumina HiSeq 1000</i>	8 días	500	100+100
<i>Illumina HiSeq 2000</i>	8 días	1.000	100+100
<i>SOLiD – 5500 (PI)g</i>	8 días	>700	75+35
<i>SOLiD – 5500xl (4hq)g</i>	8 días	>1.410	75+35
<i>Illumina HiSeq 2000 – v3fg</i>	10 días	≤3.000	100+100

Illumina es la tecnología de secuenciación más utilizada debido a que ofrece plataformas efectivas, que generan un buen número de *reads* (Tabla 4), con baja tasa de error y a un costo accesible, aunque no permite la obtención de genomas cerrados (certeza de haber cubierto y ensamblado la totalidad de la secuencia completa de un organismo). Esta metodología se basa en la secuenciación por síntesis. Durante cada ciclo de secuenciación, se agrega un dNTP marcado a la cadena de ácido nucleico naciente, que sirve de terminador reversible para la polimerización. Luego de la incorporación del dNTP, la fluorescencia del mismo permite identificar la base agregada, y el dNTP es posteriormente removido enzimáticamente, permitiendo el agregado de otro nucleótido. Así, tras la detección de la incorporación del fluoróforo, y la eliminación del mismo, es posible continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido (Illumina, 2010).

El uso de tecnologías de tercera generación ha ido cobrando un mayor protagonismo; dentro de estas plataformas se encuentra *Pacific BioSciences* (PacBio), que permite la secuenciación de una única molécula de ADN en tiempos extremadamente cortos, generando lecturas mucho más largas que las producidas por métodos de segunda generación (**Tabla 4**), lo que redundaría en una mayor continuidad del genoma ensamblado (Rhoads & Au, 2015). A diferencia de los métodos de segunda generación, PacBio está basada en la secuenciación *Single Molecule Real Time* (tecnología SMRT), en la cual la información de la secuencia se captura durante la replicación de la molécula de ADN blanco, en tiempo real, permitiendo incluso detectar modificaciones tales como metilación. La secuenciación se realiza sobre un chip que contiene pequeñas unidades que permiten el pasaje de luz. Dentro de cada una de estas unidades se encuentran inmovilizadas una ADN polimerasa y una molécula de ADN blanco de cadena sencilla. Debido a que los cuatro nucleótidos están marcados con fluoróforos distintos, generan espectros de emisión diferentes que son detectados tras su incorporación, generando un espacio de visualización que permite monitorizar la actividad de la ADN polimerasa. Pese a las ventajas ya mencionadas en cuanto a longitud de *reads* generados y tiempo empleado, esta plataforma presenta un menor rendimiento respecto a otras tecnologías, acompañado de mayor tasa de error y elevado costo por base. Es por ello que una aproximación muy utilizada en la actualidad es la secuenciación híbrida, que consiste en la combinación de dos plataformas, una de segunda generación como Illumina, donde se generan secuencias más cortas pero con una tasa de error muy baja; y PacBio, donde se generan lecturas largas contra las cuales mapear los *reads* generados por la primera. De esta manera se obtienen alineamientos confiables, que permiten la obtención de genomas cerrados (Rhoads & Au, 2015). Con ventajas similares, también la aproximación denominada MinIon de *Oxford Nanopore Technologies*, además de ofrecer lecturas más largas, es portátil, simplificando al máximo la preparación de la muestra y los protocolos de secuenciación (Lu, Giordano, & Ning, 2016). Con estas tecnologías a disposición, lograr genomas cerrados de *Leptospira* spp. es un objetivo factible y de gran interés para avanzar en el conocimiento de su biología, pues para la mayoría de las especies del género aún no se cuenta con dicha calidad de información.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es desarrollar e implementar métodos moleculares de detección y tipificación de bacterias del género *Leptospira*, así como avanzar en profundidad en el análisis de la variabilidad genética de las cepas circulantes en Uruguay. Los conocimientos y resultados generados permitirán mejorar las herramientas de diagnóstico y de control de esta zoonosis.

2.1.1 Objetivos específicos

2.1.1.1 Desarrollar y aplicar herramientas moleculares para el diagnóstico y tipificación de *Leptospira* spp.

Se buscará adaptar y validar métodos moleculares utilizados para la detección de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación del gen *lipL32* por PCR convencional y en tiempo real. Se analizará la variabilidad genética y fenotípica de una colección de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp mediante el uso combinado de métodos serológicos y moleculares.

2.1.1.2 Obtener la secuencia de genomas completos de cepas autóctonas de *Leptospira* spp. en búsqueda de determinantes genéticos que se correlacionen con la diversidad de serovares

La secuenciación genómica se complementará con análisis bioinformático, y genómica comparativa incluyendo también genomas ya disponibles en bases de datos de acceso público. Esta información será valiosa para la identificación de nuevos marcadores moleculares conservados en todos los aislamientos, de utilidad en diagnóstico, así como secuencias específicas de serovar, con aplicación en tipificación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Procesamiento de muestras biológicas de animales con sospecha de leptospirosis

Todas las muestras biológicas de bovinos (*Bos taurus*) que fueron estudiadas en este proyecto de tesis fueron recolectadas en el marco de un proyecto inter-institucional y multicéntrico que tuvo como objetivo central la generación de un banco de cepas autóctonas de *Leptospira* spp. obtenidas a partir de bovinos con sospecha de leptospirosis.

3.1.1 Orinas

Durante un período de 33 meses comprendidos entre enero de 2015 y setiembre de 2017, veterinarios pertenecientes al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, muestrearon 48 establecimientos ganaderos con sospecha de leptospirosis en base a datos de serología positiva para *Leptospira* spp. y antecedentes de pérdidas reproductivas, recolectando un total de 963 muestras de orina. Dichas muestras se enviaron a la Unidad Mixta Pasteur+INIA, donde a partir de las mismas se realizó la extracción de ADN y posterior búsqueda de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación parcial del gen *lipL32*.

Las muestras de orina se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a su recolección. Luego de homogeneizar mediante agitación leve, se trasvasaron 10 mL de cada muestra a un tubo (Falcon) estéril y se centrifugaron a 10000 xg, durante 15 minutos y a 25°C. Culminada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 mL de PBS 1X estéril (8,0 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na₂HPO₄; 0,24 g/L KH₂PO₄; pH 7,4), centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones. Al pellet resultante se le agregó 1 mL de PBS 1X y se transfirió a un tubo de microcentrífuga, repitiendo a continuación el paso de centrifugación. A partir del pellet obtenido se realizó la extracción de ADN para la subsecuente detección de especies patógenas de *Leptospira* mediante PCR (amplificación del gen *lipL32*).

3.1.2 Muestras de tejidos de material cadavérico

3.1.2.1 Procedentes de bovinos

En el período comprendido entre mayo de 2015 y diciembre de 2017, se procesaron 99 fetos bovinos que inicialmente fueron recibidos por los laboratorios veterinarios del MGAP (regional noroeste, y sede central), y por la Plataforma de Salud Animal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (sede La Estanzuela), para realización de diagnóstico diferencial de aborto. El material

cadavérico fue procesado en cada uno de los laboratorios según protocolos establecidos, y se remitió el homogenato de cada tejido a la Unidad Mixta Pasteur+INIA para extracción de ADN y posterior detección de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación parcial del gen *lipL32*.

Se procesaron principalmente muestras de hígado, riñón y líquido abomasal, pero también se recibieron muestras de bazo, vejiga y placenta, entre otros. En el procesamiento de los órganos, se tomó 1 mL de homogenato y se centrifugó a 10000 xg, durante 15 minutos y a 25°C. El pellet resultante se empleó en la extracción de ADN. En el caso del líquido abomasal, se transfirieron 2 mL a un falcon y se agregaron 8 mL de PBS 1X estéril. Luego de homogeneizar mediante vórtex, se centrifugó en las condiciones ya mencionadas y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. Se trasvasó la totalidad del volumen a un tubo de microcentrífuga repitiendo el paso de centrifugación. A partir de este pellet se realizó la extracción de ADN.

3.1.2.2 Procedentes de jabalíes

Con autorización del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, se tuvo acceso a material cadavérico de jabalíes (*Sus scrofa* salvaje), disponibles en eventos organizados por Municipios del país en relación a actividades deportivas autorizadas de caza. En la Unidad Mixta Pasteur+INIA, se procesaron 32 riñones tomando 25 miligramos de cada uno de ellos (de diferentes puntos), y cortando en pequeñas secciones para proceder luego a la digestión del tejido, tal y como se describirá a continuación.

3.1.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de cada matriz biológica se realizó mediante el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit de *Invitrogen*, siguiendo las instrucciones del fabricante para cada tipo de muestra. La obtención de ADN en cada caso fue debidamente validada, contaminando cada tipo de muestra con un inóculo bacteriano de densidad conocida y midiendo concentración de ADN luego de la extracción.

Brevemente, el sistema empleado se basa en la adsorción específica del ADN a una membrana de sílica en presencia de alta concentración de sales. En primer lugar, una etapa de lisis en la que se utilizan sales caotrópicas permite extraer el ADN de la célula, pero también otros contaminantes celulares tales como proteínas y ARN, que son luego eliminados por la acción de enzimas específicas. En esta etapa, las muestras son incubadas durante un tiempo determinado con el buffer de lisis (durante al menos 1 hora para muestras de orina, y entre 2-4 horas para muestras de

tejido), y en presencia de proteinasa K a 56°C, temperatura óptima a la cual trabaja esta enzima. Una vez digerido el material, se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos con ARNasa para eliminación del ARN contaminante. Una segunda etapa, en la que se promueve la unión del ADN a la sílica, consta del agregado de un buffer de alta fuerza iónica, que contiene detergentes (para mejorar la especificidad), y alcohol etílico absoluto (para fijar el ADN a la membrana y permitir los posteriores pasos de lavado y purificación del ácido nucleico). Luego de agregados buffer y alcohol, se procede a la centrifugación de la columna a 10000 xg durante 1 minuto, quedando el ADN adsorbido a la membrana, y el resto del volumen conteniendo contaminantes dentro del tubo colector. Una tercera fase constituida por dos lavados sucesivos, permiten eliminar contaminantes adicionales sin desestabilizar la interacción ADN-sílica. Luego de agregado el primer buffer de lavado, se centrifuga a 10000 xg durante 1 minuto, y se elimina el volumen colectado en el tubo, colocando la columna en uno nuevo, para un segundo lavado. Tras la adición del segundo buffer de lavado, se centrifuga nuevamente a 10000 xg, durante 3 minutos, eliminándose el volumen que pasa a través de la membrana, y colocando la columna de purificación en un tubo de microcentrífuga donde finalmente se eluirá el ADN. En este último paso, el agregado de un buffer de baja fuerza iónica rompe la interacción ADN-sílica, resolubiliza el ADN, y el mismo es eluido tras centrifugación a 10000 xg, durante 1,5 minutos. Para ADN proveniente de orina se empleó un volumen de elución de 100 µL, mientras que para ADN obtenido a partir de tejidos dicho volumen fue de 150µL. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

Cada muestra de ADN se almacenó a 4°C hasta su uso en PCR. Luego, para evitar su degradación se conservaron a -20°C.

3.2 Detección de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación del gen *lipL32*

3.2.1 PCR convencional

La detección de especies patógenas del género *Leptospira* se llevó a cabo mediante amplificación del gen *lipL32*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos LipL32F (5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3') y LipL32R (5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3') (Ahmed et al., 2006), que dan lugar a un producto de 474 pb. Las concentraciones de reactivos en la mezcla de reacción se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Concentraciones de reactivos para la PCR *lipL32*. Las concentraciones empleadas son las establecidas en (Ahmed et al., 2006), a excepción de la concentración de oligonucleótidos que fue levemente modificada y la BSA que fue agregada con el propósito de captar inhibidores que afecten la reacción de amplificación.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Buffer	10 X	1 X
MgCl₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	5 mM	200 µM
BSA	5 mg/mL	0.25µg/µL
LipL32 F	10µM	1 µM
LipL32 R	10µM	1 µM
Taq	5U/µL	1 U/reacción
H₂O DNAsa/RNAsa Free	-	-

Los controles incluidos sistemáticamente fueron: i) un control positivo, incluyendo ADN genómico de una cepa de referencia (*L. borgpetersenii* serovar Hardjo) y ii) un control sin ADN molde, para asegurar que los reactivos no estuviesen contaminados con material genético. A su vez, en el caso de PCR a partir de muestras biológicas se incluyó un control de inhibición para evidenciar el efecto de potenciales inhibidores presentes en las muestras que pudieran co-purificarse con el ADN y así descartar falsos negativos. Este control se realizó para cada muestra en estudio en un tubo separado, donde se agregó el mismo volumen de ADN molde de la muestra a analizar con la adición de 40 ng de control positivo.

Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación comprendiendo i) desnaturalización a 94°C, 30 segundos; ii) hibridación de cebadores a 58°C, 30 segundos; y iii) extensión a 72°C, 1 minuto. Por último, se incluyó una etapa final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cyclers de *Applied Biosystems*.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) en un transiluminador G:Box Chemi HR16 de *Syngene*. El tamaño del producto fue estimado mediante comparación con un estándar de pesos moleculares cuyo rango se extiende desde 100 hasta 2000 pb (100 bp DNA Ladder, *Invitrogen*).

3.2.2 PCR en tiempo real

Paralelamente al protocolo de PCR convencional, se diseñó una PCR en tiempo real (qPCR) también dirigida a la detección del gen *lipL32*, pero teniendo como blanco de amplificación una zona diferente.

Las secuencias de *lipL32* utilizadas en el diseño de oligonucleótidos fueron obtenidas a partir de la plataforma PATRIC 3.5.14 (<https://www.patricbrc.org>); estas secuencias se alinearon mediante el software MEGA 6.0 (<https://www.megasoftware.net/>) con la finalidad de detectar zonas de alta homología para que la hibridación de los oligonucleótidos abarcara todas las especies disponibles; el diseño de cebadores fue realizado teniendo en cuenta las consideraciones básicas en cuanto a longitud, contenido de GC y temperatura de *melting*. Estos parámetros, y algunos otros aspectos tales como la formación de horquillas o dímeros se chequearon mediante la herramienta online OligoAnalyzer 3.1 de *Integrated DNA Technologies*, IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>), así como también se evaluó su especificidad mediante Primer-BLAST del *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). El producto de amplificación obtenido mediante los oligonucleótidos diseñados presentó un tamaño de 102 pb. La secuencia de estos cebadores, y otros parámetros de interés se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Parámetros generales de oligonucleótidos diseñados para la detección de *lipL32* mediante qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud (nucleótidos)	T _m (°C)	Contenido en GC (%)	Tamaño amplificación (pb)
LipL32-188F	TAAAGCCAGGACAAGCGCC	19	58	58	102
LipL32-270R	TACGAACTCCCATTTCAGCG	20	55	50	

Dado que la finalidad de esta PCR es detectar presencia/ausencia de ADN específico de especies patógenas de *Leptospira* aplicada al diagnóstico de la enfermedad, se optó por una cuantificación absoluta referenciada a una curva estándar de concentraciones conocidas expresada en unidades de genomas/ μ L, que se construyó a partir de una cepa patógena correspondiente a *L. interrogans*. Para ello, se partió de un cultivo puro en fase exponencial cuya densidad bacteriana (bacterias/mL) se determinó mediante recuento en cámara de Petroff-Hausser. Se realizó la extracción de ADN a partir de 1 mL de este cultivo empleando el kit PureLink Genomic DNA Mini

Kit de *Invitrogen* (apartado 3.1.3) y se cuantificó la concentración exacta de ADN mediante fluorescencia en un Qubit 2.0 Fluorometer de *Invitrogen*, empleando el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (*Invitrogen*). Se realizaron diluciones seriadas del ADN al décimo, obteniéndose un rango de 7 concentraciones para la curva estándar. La relación entre concentración de ADN y copias genómicas se estableció teniendo en cuenta que un genoma de *L. interrogans* (4.6 Mb) es equivalente a 5 femtogramos de ADN genómico (Bourhy et al., 2011b).

Se eligió como método de detección el agente intercalante SYBR Green I, que se une de manera inespecífica al surco mayor de la doble hélice de ADN, emitiendo fluorescencia. Debido a su inespecificidad fue necesaria una caracterización posterior del producto mediante el análisis de la curva de disociación, en la cual el producto específico amplificado por los cebadores diseñados presenta una T_m de 76°C.

Además de los controles habituales, se incluyó un control interno de amplificación (IAC) que actúa como control de inhibición. Este control se diseñó en base a pautas establecidas (Hoorfar et al., 2004), optándose por una secuencia competitiva, es decir, una secuencia no relacionada con el ADN blanco, pero que es amplificada por el mismo par de oligonucleótidos. Dada la alta frecuencia con la que se emplean secuencias de virus que infectan peces para esta finalidad, se optó por el virus CEV, que produce edemas y hemorragias en *Cyprinus carpio* (pez carpa); el IAC se diseñó tomando como molde la región 5'-UTR del ARN mensajero de este virus, y se agregaron en ambos extremos de la secuencia las regiones donde hibridan los oligonucleótidos LipL32-188F y LipL32-270R (**Tabla 6**). La secuencia resultante tiene 200 pb y una T_m de 83°C, por lo que es fácilmente diferenciable de la T_m del producto de amplificación específico. Se chequeó formación de dímeros y horquillas con OligoAnalyzer 3.1, y la especificidad del control mediante Primer-BLAST, para corroborar que dicha secuencia no hibrida con ningún otro microorganismo, a excepción del virus. Previo a su inclusión en la mezcla de PCR, se puso a punto la concentración mínima necesaria de control interno para que no interfiriera con el límite de detección de ADN blanco determinado para la reacción. Para ello se realizó una pequeña curva de concentraciones conocidas de IAC, desde 10 copias/reacción hasta 10000 copias/reacción; cada punto de la curva fue sometido a PCR (en las condiciones luego mencionadas) en presencia de la mínima cantidad de ADN blanco detectable, y se evaluó amplificación conjunta de ambos productos. La secuencia del control interno se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Control interno de amplificación para la qPCR de *lipL32*. El control interno es amplificado con los oligonucleótidos LipL32-188F y LipL32-270R, al igual que el gen *lipL32*. La zona de hibridación de los mismos se encuentra subrayada en la secuencia del IAC. Dado que la secuencia de ADN utilizada para el diseño del control interno no está relacionada a *Leptospira* ni otros géneros bacterianos, su amplificación únicamente será indicativa de ausencia de inhibidores.

IAC	Secuencia (5'-3')	Longitud (nucleótidos)	Tm (°C)	Contenido GC (%)
CEV-32	<u>TAAAGCCAGGACAAGCGCCCCTTCTTGTGCTGCAGCTGC</u> TCCACCTGCTACCCAAGCTGCTGCCACCAGCTCCTACCAT CAAGCAGCTGCTCCACCTGCTACAATTCCAAGAGCATCTA CCTTCTAGTCTCTATCCTTGCTGCTCCACCTGCACATCA ACATCGTACTTACATCGGAACGCTGAAATGGGAGTTCGTA	200	83	53

Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa inicial de activación de la enzima a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación comprendiendo i) desnaturalización a 95°C, 30 segundos e ii) hibridación de cebadores y extensión en una única etapa a 60°C, 30 segundos. Inmediatamente después de la amplificación se incluyó el ciclado para la curva de *melting* que abarca tres etapas: i) 95°C, 15 segundos, ii) 60°C, 15 segundos y iii) nuevamente 95°C, 15 segundos. Todas las PCR fueron realizadas por triplicado en placas de 48 pocillos, en un termociclador Eco™ Real-Time PCR System de *Illumina*.

El análisis de los resultados fue realizado mediante el software EcoStudy de *Illumina* (https://support.illumina.com/downloads/eco_real_time_pcr_software_v5-0.html).

3.3 Cultivo y aislamiento de cepas de *Leptospira* spp.

3.3.1 Preparación de EMJH suplementado con seroalbúmina bovina

Para la preparación de EMJH suplementado con seroalbúmina bovina, se utilizó la base comercializada por *BD Difco*™, *Leptospira* Medium Base EMJH, la cual está compuesta por cloruro de amonio (fuente de nitrógeno), tiamina (factor de crecimiento), fosfato de sodio y potasio (amortiguadores del pH), y cloruro de sodio (balance osmótico de la solución). El pH de esta solución se ajustó a 8, y se esterilizó por autoclavado a 121°C, durante 20 minutos.

Por otro lado, se preparó el suplemento, que contiene albúmina, Tween 80 y factores de crecimiento adicionales. Para la preparación de este suplemento se adquirió una seroalbúmina bovina enriquecida en lípidos, elaborada específicamente para el crecimiento de *Leptospira* spp. (Bovolep,

Bovogen Biologicals). Se disolvió en agua previamente autoclavada, y luego se agregaron los otros aditivos necesarios que también fueron esterilizados mediante autoclave a excepción de la vitamina B12 que se esterilizó por filtración. Una vez disuelto todo, se agitó durante 20 minutos hasta mezclado homogéneo, y se esterilizó por filtro de 0.22 μm . Se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Se realizó la mezcla de base y suplemento, se mezcló y ajustó el pH a 7.5 ± 0.2 , y se esterilizó por filtros 0.22 μm . En el caso de medio empleado para cultivos en proceso de purificación, se agregó 5'-fluorouracilo previamente esterilizado por filtración, a una concentración final de 0.1 g/L. En la **Tabla 8** se detallan todos los componentes utilizados en la elaboración del medio EMJH suplementado con albúmina.

Tabla 8. Composición de medio base, suplemento y medio EMJH suplementado.

Componentes		Concentración stock (g/L)	Concentración final (g/L)
Medio Base (BD Difco™)	Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NaCl, NH ₄ Cl, Tiamina	-	2.6
	BSA	-	100
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4	0.04
	MgCl ₂ .6H ₂ O	15	0.15
	CaCl ₂ .2H ₂ O	15	0.15
Suplemento	Piruvato de sodio	100	1.0
	Vitamina B12	0.2	0.002
	Glicerol	-	4.0
	Tween 80	-	12.5
	FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0.5
Medio Base	Medio Base	2.6	2.3
Suplementado	Suplemento	100*	20*

*concentración de suplemento referida a la concentración de BSA.

3.3.2 Cultivo de *Leptospira* spp.

Los cultivos fueron incubados a 29°C, con agitación a 100 rpm y monitoreados semanalmente bajo microscopio de campo oscuro (AxioImager A2 LED con condensador de campo oscuro, *Carl Zeiss*).

El principal contaminante en cultivos provenientes de muestras biológicas, especialmente en aquellos derivados de orina, fueron bacilos. El método empleado para la descontaminación de estos cultivos, además de emplear medio EMJH con 5'FU, fue la filtración por filtros de 0.22 µm.

3.3.3 Conservación de cepas

Tanto los aislamientos provenientes de muestras biológicas como las cepas de referencia fueron conservadas tras ser repicadas en medio sin 5'FU, y alcanzada la fase exponencial de crecimiento mediante criopreservación en nitrógeno líquido utilizando DMSO 2.5% (v/v) como crioprotector.

3.4 Caracterización de las cepas autóctonas de *Leptospira* spp.

3.4.1 Determinación de especie mediante amplificación y secuenciación parcial del gen de ARNr 16S

La determinación de especie de los aislamientos autóctonos estudiados en este trabajo, se llevó a cabo mediante amplificación del gen de ARNr 16S (*rrs*) y posterior secuenciación del producto de amplificación. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos específicos para el género *Leptospira* LeptoA (5'- GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') y LeptoB (5'- TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') (Mérien et al., 1992), que dan lugar a un producto de 331 pb. Para la secuenciación de dicho producto se usaron los oligonucleótidos internos LeptoC (5'- CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3') y Rs4 (5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3') (Mérien et al., 1992). Las concentraciones de reactivos utilizadas se resumen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Concentraciones de reactivos para la amplificación del gen *rrs*. Las concentraciones empleadas son las establecidas en (Mérien et al., 1992).

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Buffer	10 X	1 X
MgCl₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	5 mM	200 µM
LeptoA	10µM	0.2 µM
LeptoB	10µM	0.2 µM
Taq	5U/µL	1 U/reacción
H₂O DNAsa/RNAsa Free	-	-

Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación comprendiendo i) desnaturalización a 94°C, 30 segundos; ii) hibridación de cebadores a 55°C, 30 segundos; y iii) extensión a 72°C, 45 segundos. Por último, se incluyó una etapa final de extensión a 72°C durante 5 minutos. Todas las PCR se realizaron en un termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cyclers de *Applied Biosystems*.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) en un transiluminador G:Box Chemi HR16 de *Syngene*. El tamaño del producto fue estimado mediante comparación con un estándar de pesos moleculares cuyo rango se extiende desde 100 hasta 2000 pb (100 bp DNA Ladder, *Invitrogen*). No se purificó el producto de PCR previo a secuenciación debido a la excelente performance de la PCR. Para la secuenciación de dicho producto se usaron los oligonucleótidos internos LeptoC (5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3') y Rs4 (5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3') (Mérien et al., 1992). Los productos de amplificación fueron secuenciados mediante la tecnología Sanger (Macrogen, Corea).

Los cromatogramas de las secuencias resultantes se analizaron mediante el software Chromas 2.6.5 (<https://technelysium.com.au/wp/>). La secuencia consenso se obtuvo con el software BioEdit 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La especie se asignó mediante comparación con secuencias disponibles en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a través de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4.2 Genotipificación mediante amplificación y secuenciación parcial del gen *secY*

La genotipificación de cepas autóctonas se llevó a cabo mediante amplificación del gen *secY* y posterior secuenciación del producto de PCR. Tanto en la amplificación como en la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos específicos SecYF (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') y SecYR (5'-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3') (Ahmed et al., 2006), que dan lugar a un producto de 549 pb. La secuenciación de los productos de PCR fue realizada mediante la tecnología Sanger (Macrogen, Corea).

Las concentraciones de reactivos para esta PCR, así como las condiciones de ciclado, fueron las mismas que las utilizadas para la PCR del gen *rrs* (ver apartado 3.4.1).

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) en un transiluminador G:Box Chemi HR16 de *Syngene*. El tamaño del producto fue estimado mediante comparación con un estándar de pesos moleculares cuyo rango se extiende desde 100 hasta 2000 pb (100 bp DNA Ladder, *Invitrogen*). No se purificó el producto de PCR previo a secuenciación debido a la excelente performance de la PCR.

Los cromatogramas de las secuencias resultantes se analizaron mediante el software Chromas 2.6.5. La secuencia consenso se obtuvo con el software BioEdit 7.0.5.3. Para la construcción de los árboles filogenéticos, se consideró el alelo MLST de 501 pb (Ahmed et al., 2011).

3.4.3 Análisis filogenético a partir de productos de secuenciación de *rrs* y *secY*

El análisis de filogenia se realizó con el software MEGA 6.0 (<https://www.megasoftware.net/>), utilizando el método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei. La distribución de los clados se validó por medio de la generación de 1000 réplicas mediante método bootstrap (Liò & Goldman, 1998). Las secuencias de *rrs* contra las cuales se compararon las secuencias de los aislamientos autóctonos fueron extraídas de la bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), mientras que las secuencias de *secY* fueron obtenidas de PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>); la asignación del alelo para *secY* se realizó comparando con las secuencias disponibles en PubMed-MLST *Leptospira* (<https://pubmlst.org/leptospira/>).

3.4.4 Determinación de serogrupo mediante reacción con antisueros de referencia por MAT

La determinación de serogrupo fue llevada a cabo utilizando la técnica de MAT (Faine, 1999). Cada aislamiento se enfrentó a un panel de antisueros de referencia adquiridos en el KIT (*Royal Tropical Institute*, Holanda), específicos contra los 24 serogrupos más relevantes de *Leptospira* spp. (**Tabla 10**). La reacción de aglutinación fue realizada en placas de microtitulación, mezclando volúmenes iguales de un cultivo de 10^7 leptospiaras/mL y dilución 1:200 de cada suero. Se incubó durante 2 horas a 37°C, y se observó aglutinación al microscopio de campo oscuro. Se consideran aglutinación positiva aquellas reacciones en la que sólo permanecen libres el 50% o menos de las leptospiaras totales. Cuando la aglutinación fue positiva con uno o más antisueros, se realizó una titulación con diluciones seriadas de los mismos, asignando el serogrupo del antisuero con el que presentó mayor título de aglutinación.

Tabla 10. Antisueros de referencia usados en la determinación de serogrupo mediante MAT. Se indica la cepa de *Leptospira* spp. utilizada por el KIT para la producción del antisuero de referencia correspondiente.

Antisuero	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	Australis	Australis	Ballico
2	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	Bataviae	Argentinensis	Peludo
4	Canicola	Portlandvere	MY 1039
5	Ballum	Castellonis	Castellon 3
6	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	Grippotyphosa	Grippotyphosa type Moskva	Moskva V
8	Sejroe	Hardjo type bovis	Sponselee
9	Hebdomadis	Goiano	Bovino 131
10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
11	Panama	Panama	CZ 214
12	Semaranga	Patoc	Patoc I
13	Pomona	Proechimys	1161 U
14	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	Sejroe	Sejroe	M 84
16	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
17	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
18	Celledoni	Celledoni	Celledoni
19	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	Mini	Mini	Sari
21	Sarmin	Rio	Rr 5
22	Shermani	Shermani	1342 K
23	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
24	Louisiana	Louisiana	LSU 1945

3.4.5 Asignación de serovar presuntivo mediante análisis de VNTR

La caracterización de cepas a nivel de serovar se realizó mediante análisis de repetidos en tándem, VNTR, de acuerdo a métodos ya publicados (Salaün et al., 2006). Se amplificaron 5 alelos VNTR distintos, cuya combinatoria, junto con la tipificación serológica (apartado 3.4.4) y la identificación de especie (apartado 3.4.1), permitió inferir el serovar de cepas pertenecientes a las especies *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. Para las primeras se amplificaron los loci VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10, mientras que para las segundas se amplificaron los loci VNTR-10, VNTR-Lb4 y VNTR-Lb5. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de cada alelo se resumen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los diferentes alelos VNTR (Salaün et al., 2006).

Alelo	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
VNTR-4	4a_bis	AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA
	4b_bis	ATAAAGGAAGCTCGGCGTTT
VNTR-7	7a_bis	GATGATCCCAGAGAGTACCG
	7b	TCCCTCCACAGGTTGTCTTG
VNTR-10	10a_bis	GAGTTCAGAAGAGACAAAAGC
	10b_bis	ACGTATCTTCATATTCTTTGCG
VNTR-Lb4	Lb4a	AAGAAGATGATGGTAGAGACG
	Lb4b	ATTGCGAAACCAGATTTCCAC
VNTR-Lb5	Lb5a	AGCGAGTTCGCCTACTTGC
	Lb5b	ATAAGACGATCAAGGAAACG

Las concentraciones de reactivos empleadas en la reacción de amplificación se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Concentraciones de reactivos para la PCR de repetidos en tándem. Las concentraciones empleadas son las establecidas en (Salaün et al., 2006).

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Buffer	10 X	1 X
MgCl₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	5 mM	100 µM
OligoF	10µM	0.2 µM
OligoR	10µM	0.2 µM
Taq	5U/µL	1 U/reacción
H₂O DNAsa/RNAsa Free	-	-

Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación comprendiendo i) desnaturalización a 95°C, 30 segundos; ii) hibridación de cebadores a 55°C, 30 segundos; y iii) extensión a 72°C, 1 minuto. Por último, se incluyó una etapa final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler de *Applied Biosystems*.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (para alelos VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10) y 1.0% (para alelos VNTR-Lb4 y VNTR-Lb5), y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador G:Box Chemi HR16 de *Syngene*. El tamaño de los alelos amplificados fue determinado empleando el software GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>), teniendo como referencia un estándar de pesos moleculares cuyo rango se extiende desde 100 hasta 2000 pb (100 bp DNA Ladder, *Invitrogen*). El tamaño del amplicón está dado por: el tamaño de la región flanqueante más el tamaño del repetido teniendo en cuenta el número de veces que se repite. Por tanto, conociendo el tamaño del amplicón, el número de repetidos es fácilmente determinado (**Tabla 13**).

Tabla 13. Loci VNTR propuesto para *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. Adaptado de (Salaün et al., 2006).

Alelo	Tamaño del producto de PCR (pb)	
	<i>L. interrogans</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
VNTR-4	425 + 34n	425 + 34n
VNTR-7	299 + 46n	No amplifica
VNTR-10	420 + 46n	333 + 46n
VNTR-Lb4	No amplifica	573 + 60n
VNTR-Lb5	668 + 39n	722 + 36n

n es el número de repeticiones.

3.5 Secuenciación de genomas completos

3.5.1 Extracción de ADN y determinación de su calidad

Para la secuenciación de los genomas completos de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp., se partió de cultivos en fase exponencial. Se tomaron 5 mL de estos cultivos y se centrifugaron a 10000xg, durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pellet bacteriano resultante fue empleado para la extracción de ADN, la cual se realizó mediante el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen (apartado 3.1.3).

Una vez obtenido el ADN, se procedió a la determinación de su concentración, así como a la evaluación de su pureza mediante relación de absorbancias a 260 y 280 nm. La concentración de ADN fue determinada mediante fluorescencia, empleando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, de Invitrogen que es selectivo para ADN doble hebra. Las medidas fueron realizadas en el Qubit 2.0 Fluorometer de Invitrogen. La relación A_{260}/A_{280} fue obtenida empleando el Nanodrop 1000, considerándose suficientemente puras aquellas muestras con una relación ≥ 1.8 .

3.5.2 Construcción de librerías de ADN

Luego de contar con ADN de buena calidad ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$) y cantidad (100 μ L a una concentración ≥ 20 ng/ μ L), se procedió a la construcción de librerías de ADN utilizando el kit Nextera® XT DNA Library Prep (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, la construcción de librerías implicó una primera etapa de fragmentación y etiquetado del ADN con secuencias adaptadoras en un único paso, seguido de la amplificación del ADN mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados en esta amplificación permiten agregar las

secuencias de indexado, que son requeridas para la formación de *clusters* en la placa de secuenciación. Una tercera etapa, es la purificación de las librerías obtenidas mediante el kit AMPure XP beads (*New England BioLabs*). Este kit, basado en perlas magnéticas, permite la remoción de fragmentos cortos de ADN, tales como dímeros de oligonucleótidos. Por último, se chequeó la calidad de las librerías mediante el sistema de microelectroforesis capilar *Agilent Technology 2100 Bioanalyzer*, usando un High Sensitivity DNA chip, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las librerías de ADN así obtenidas fueron almacenadas a -20 °C hasta su secuenciación.

3.5.3 Secuenciación de genomas completos empleando el sistema MiSeq de Illumina

La secuenciación de los genomas completos de aislamientos autóctonos fue realizada empleando el kit MiSeq® Reagent Kit v3, en el secuenciador MiSeq (disponible en el Institut Pasteur de Montevideo), según indicaciones del fabricante. El kit de reactivos MiSeq es de único uso e incluye un tipo de celda de flujo específico para ese kit y todos los reactivos necesarios para realizar la corrida de secuenciación: buffer de lavados y cartucho de reactivos, donde se inyectan todas las librerías de ADN a secuenciar en condiciones de equimolaridad (Illumina, 2015). Sobre la celda de flujo tendrá lugar la amplificación clonal de fragmentos de ADN, que posteriormente serán secuenciados mediante la técnica de síntesis ya mencionada: se emplean los cuatro nucleótidos (A, C, T, G) marcados con distintos fluoróforos para la secuenciación de los millones de fragmentos presentes en la superficie de la celda. Estos nucleótidos modificados contienen terminaciones reversibles, lo que permite que cada ciclo del proceso de secuenciación ocurra en presencia de los cuatro nucleótidos simultáneamente. Las señales generadas se digitalizan, y se obtiene la secuencia nucleotídica de los fragmentos generados en la secuenciación.

Antes de comenzar la secuenciación de las librerías de ADN, se determinó la concentración de las mismas por fluorescencia (Qubit 2.0), se diluyeron en el tampón de hibridación suplementado con el kit de secuenciación, de modo de llevar todas las librerías a una concentración de 12 picomolar, y se inyectaron en el cartucho de secuenciación.

3.5.4 Secuenciación de genomas completos empleando el sistema NextSeq 500 de Illumina

Además de secuenciar en la plataforma del Institut Pasteur de Montevideo, algunas muestras fueron secuenciadas en la plataforma de secuenciación PIBnet, disponible para la Red Internacional de Institutos Pasteur (Institut Pasteur, París, Francia). Se envió por correo ADN en las condiciones de cantidad y calidad antes mencionadas, y la secuenciación se llevó a cabo en el sistema NextSeq 500 (*Illumina*).

3.6 Ensamblaje, anotación y análisis de genomas

3.6.1 Evaluación de calidad de los datos crudos de secuenciación

Los equipos de secuenciación utilizados producen archivos de salida en forma digital a medida que avanzan automáticamente con el proceso físico de secuenciación genómica. Entre los archivos generados se encuentran aquellos con extensión “.fastq”. Este formato de archivo constituye el *input* estándar crudo reconocido por los programas bioinformáticos habituales, para comenzar con las etapas de procesamiento de los datos. Lo primero es analizar la calidad de los datos obtenidos. La evaluación de calidad se realizó con el software FastQC del Babraham Institute (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que mediante una interfaz sencilla y gráfica permite ver la calidad de los datos de secuenciación antes de continuar con análisis posteriores. Parámetros tales como la calidad por base, el contenido de GC, presencia de adaptadores, entre otros, son representados mediante código de colores que distinguen calidades buena, regular o mala.

3.6.2 Eliminación de secuencias adaptadoras

Si bien durante el proceso de secuenciación se puede indicar que sean eliminadas las secuencias de adaptadores en los archivos resultantes, es conveniente verificar durante la evaluación de calidad, y asegurar de eliminarlos mediante algún programa específico. Esto fue realizado mediante el software Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (Bolger et al., 2014), que incluye una amplia variedad de etapas en el procesamiento y filtrado de las lecturas resultantes, pero a diferencia de otros programas de similar funcionalidad, incluye algoritmos relacionados a la identificación de secuencias adaptadoras empleadas en sistemas *Illumina*. Luego de recortar las

secuencias adaptadoras y filtrar mediante Trimmomatic, se evaluó nuevamente la calidad de los *reads* mediante FastQC.

3.6.3 Ensamblaje *de novo*

El ensamblaje *de novo* de los genomas se realizó mediante el software SPAdes 3.12.0 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Este programa se basa en la construcción de grafos de Bruijn, que representan solapamientos entre secuencias de símbolos. El grafo tiene m vértices que consisten en todas las posibles secuencias de longitud n de los símbolos dados. Este n (k-meros) corresponde a la ventana de lectura establecida, es decir, cada cuántos nucleótidos irá leyendo el programa; estas secuencias después serán solapadas en la reconstrucción del genoma. Se utilizan diferentes k-meros a fin de llegar al alineamiento más probable. Los k-meros empleados fueron 21, 33 y 55 (Bankevich et al., 2012).

3.6.4 Evaluación de la calidad del genoma ensamblado

La evaluación de la calidad de los genomas ensamblados se realizó mediante el software Quast (<http://quast.sourceforge.net/quast>). Este programa es fácil de usar y permite evaluar parámetros de calidad del ensamblaje tales como número de *contigs* o fragmentos totales del ensamblado, N50 (tamaño del *contig* más pequeño para cubrir el 50% del genoma, habiendo ordenado los *contigs* de mayor a menor tamaño), y L50 (número de *contigs* necesarios para cubrir el 50% del genoma). Estos parámetros nos dan una idea de que tan fragmentado se encuentra el genoma ensamblado (Gurevich et al., 2013).

Aquellos genomas que presentaron parámetros no óptimos (número de *contigs* > 450, N50 < 16000, L50 > 90), fueron re-ensamblados empleando el software Assembly Improvement (https://github.com/sanger-pathogens/assembly_improvement). Este programa toma el ensamblaje original en formato fasta y las secuencias crudas en formato fastq; mediante un proceso iterativo, apunta a formar alineamientos más grandes (*scaffolds*) y cierra *gaps* que hayan quedado en el ensamblaje inicial (Page et al., 2012). Una vez concluido el mejoramiento, se re-evaluó la calidad del reensamblado mediante Quast.

3.6.5 Anotación de genomas

La asignación de identidad a las secuencias constituyentes de los genomas ensamblados se realizó mediante la herramienta informática Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>). Prokka coordina

un conjunto de herramientas de predicción existentes para identificar las secuencias génicas dentro de *contigs* y lograr una anotación rápida y confiable de genomas bacterianos (Seemann, 2014).

3.6.6 Análisis del pangenoma

Una vez obtenidos los genomas ensamblados y anotados se procedió a realizar un alineamiento de genomas completos para ver cómo se agrupaban los distintos aislamientos autóctonos secuenciados. Esto se realizó mediante el software MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), que rápidamente encuentra zonas con homología basándose en la transformada de Fourier (Kato et al., 2012).

Tras realizar el alineamiento múltiple se procedió al cálculo de identidad de nucleótidos en los genomas alineados mediante el software pANIto (<https://github.com/sanger-pathogens/panito>). Este software permite calcular el índice ANI, que ha sido propuesto como una forma de determinar el grado de relación genética entre especies bacterianas, permitiendo así establecer en función del porcentaje de ANI obtenido a partir de un alineamiento múltiple si los organismos en comparación pertenecen a la misma especie. Se considera que un valor de ANI $\geq 95\%$ se corresponde con el valor de corte de 70% proveniente del análisis de la hibridación ADN-ADN para organismos de la misma especie (Arahal, 2014).

El análisis del pangenoma se llevó a cabo mediante el software Roary (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/roary>). Este programa emplea los archivos con extensión .gff obtenidos por Prokka, y compara todos los genomas que se le suministren dando como *output* gráficos y tablas resultantes de la comparativa, tales como presencia/ausencia de genes, entre otros (Page, Cummins, et al., 2014).

3.6.7 Análisis del genoma-núcleo

El análisis del genoma núcleo, genoma central o *core genome*, se llevó a cabo mediante Phylen (<https://github.com/iferres/phylen>), un paquete escrito en el lenguaje R, que realiza la reconstrucción filogenética automática dado un conjunto de modelos ocultos de Markov (HMM) (Ferrés et al., 2018b). Los genes encontrados en todos los genomas ("*core genes*") se alinean individualmente y se concatenan en una sola secuencia supergénica. Dentro de los archivos generados, además de los alineamientos, se encuentra un archivo en formato Newick que contiene el árbol filogenético.

3.6.8 Análisis de genes MLST

Otra forma en la que fueron analizados los genomas en busca de variabilidad fue considerando los genes correspondientes a los tres esquemas de MLST. Esto fue realizado bioinformáticamente mediante el paquete de R, MLSTar (<https://github.com/iferres/MLSTar>), que permite determinar fácilmente el secuenciotipo Multi-locus (MLST) de sus genomas, mediante interacción directa con la base de datos PubMLST de *Leptospira* (<https://pubmlst.org/leptospira/>) (Ferrés et al., 2018a).

4. RESULTADOS

4.1 Detección de ADN específico de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación del gen *lipL32*

4.1.1 PCR convencional

4.1.1.1 Determinación de la especificidad y sensibilidad analítica de la PCR

La especificidad de la reacción fue ensayada con las diferentes especies y serovariedades de *Leptospira* que se detallan en la **Tabla 14**. A su vez, otros géneros bacterianos no relacionados con *Leptospira* también fueron evaluados: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. La amplificación del gen *lipL32* mostró ser específica para especies patógenas de *Leptospira*, no evidenciándose para los otros géneros incluidos (**Figura 11**).

Tabla 14. Especies y serovares de *Leptospira* empleados en la determinación de especificidad para la PCR *lipL32*.

Espece	Serovar	Espece	Serovar
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri
	Castellonis		Grippotyphosa
	Javanica		Mozdok
	Hardjo	<i>L. noguchii</i>	Panama
	Sejroe		Louisiana
	Tarassovi	<i>L. weilii</i>	Celledoni
Mayotte	Sarmin		
<i>L. interrogans</i>	Australis	<i>L. interrogans</i>	Pomona
	Autumnalis		Pyrogenes
	Bratislava		Zanoni
	Canicola		Hardjo
	Hebdomadis		Wolffii
	Copenhageni		Djasiman
Icterohaemorrhagiae	Bataviae		
<i>L. santarosai</i>	Shermani	<i>L. biflexa</i>	Patoc

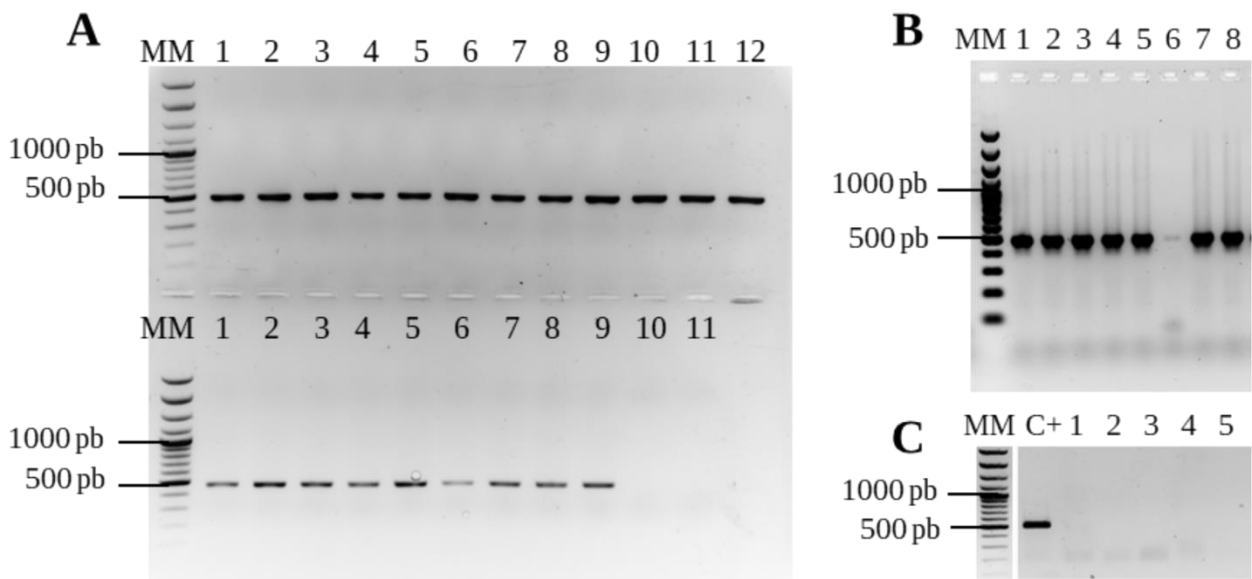


Figura 11. Evaluación de la especificidad para la amplificación del gen *lipL32*. La especificidad fue determinada en diferentes serovariedades de distintas especies patógenas de *Leptospira* (A, B), así como también en otros géneros bacterianos (C). Se incluyeron los serovares: Ballum, Castellonis, Javanica, Hardjo, Sejroe, Tarassovi (carriles 1 a 6, panel A superior) y Mayotte (carril 5, panel B) de la especie *L. borgpetersenii*; Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Hebdomadis, Copenhageni (carriles 7 a 12, panel A inferior), Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Zanoi, Hardjo, Wolfii (carriles 1 a 6, panel A inferior), Djasiman y Bataviae (Carriles 1 y 4, panel B) de *L. interrogans*; Cynopteri, Grippotyphosa y Mozdok (carriles 7 a 9, panel A inferior) de *L. kirschneri*; Panama y Louisiana (carriles 2 y 8, panel B) de *L. noguchii*; Celledoni y Sarmin (carriles 3 y 6, panel B) de *L. weilii*; Shermani (carril 7, panel B) de *L. santarosai*; y Patoc (carril 10, panel A inferior) de *L. biflexa* (no patógena). Otras especies bacterianas incluidas fueron: *Escherichia coli* (carril 1, panel C), *Pseudomonas aeruginosa* (carril 2, panel C), *Salmonella* sp. (carril 3, panel C), *Staphylococcus aureus* (carril 4, panel C) y *Enterococcus* sp. (carril 5, panel C). Como control positivo (C+) en el panel C se utilizó *L. borgpetersenii* serovar Hardjo. MM corresponde al marcador de pesos moleculares. El carril 11 del panel A inferior corresponde al control sin ADN.

La curva empleada para la determinación de la sensibilidad analítica de esta PCR se construyó a partir de un cultivo cuya densidad bacteriana fue de 10^7 leptospiras/mL. Se realizaron diluciones seriadas al décimo, en orina, llegando hasta una densidad de 1 leptospira/mL. Se procedió a la extracción de ADN para cada punto de la curva y posteriormente a la amplificación de *lipL32* en cada uno de ellos. Con las condiciones de reactivos y ciclado aplicadas, se determinó una sensibilidad analítica de detección de 1000 leptospiras (**Figura 12**).

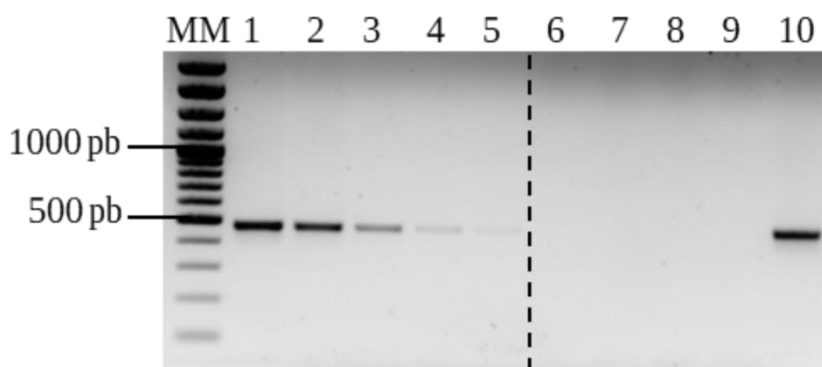


Figura 12. Sensibilidad analítica de la PCR para *lipL32*. La sensibilidad fue determinada en un rango de 10^7 a 10^0 leptospiras de orina (carriles 1 a 8, respectivamente), siendo el límite inferior de detección 1000 bacterias (carril 5). El control positivo empleado fue *L. borgpetersenii* serovar Hardjo (Carril 10). MM corresponde al marcador de pesos moleculares. En el carril 9 se incluyó un control sin ADN.

4.1.1.2 Aplicación de la PCR convencional para la detección de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de orina

De las 963 orinas procesadas, 193 resultaron positivas para la amplificación del gen *lipL32*; éstas se distribuyeron en 37 de los 48 establecimientos muestreados, significando un 77% de presencia de leptospiras patógenas a nivel de rodeo. Muchas de las orinas presentaron un claro efecto inhibitorio. Distintos tratamientos fueron evaluados para disminuir o eliminar dicha inhibición, finalmente llegando a un protocolo que incluye dos lavados sucesivos con PBS 1X del pellet obtenido por centrifugación de la orina, y luego el agregado de BSA en la mezcla de reacción (**Figura 13**).

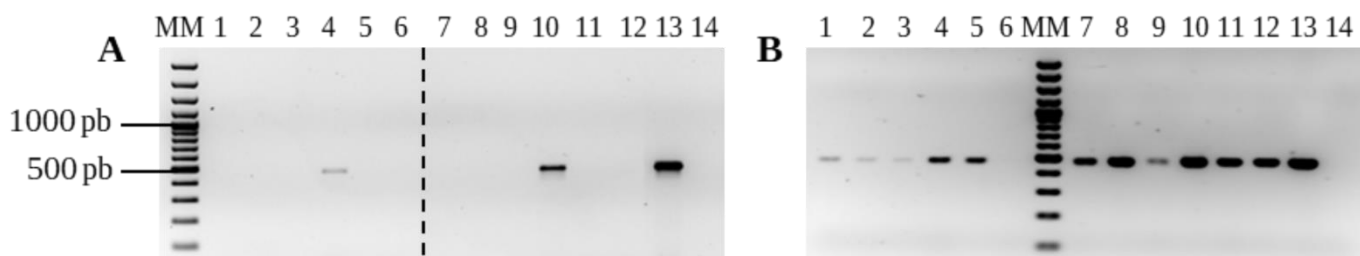


Figura 13. Efecto inhibitorio de muchas muestras de orina en la reacción de PCR. Las orinas inicialmente procesadas resultaron en su mayoría ser negativas (carriles 1 a 6, panel A), pero a excepción de la muestra positiva, el control de inhibición del resto de las orinas tampoco amplificó (carriles 7 a 12, panel A). El uso de PBS 1X para lavar los pellets de orinas, así como el agregado de BSA en la reacción, demostró revertir la inhibición (carriles 7 a 12, panel B), y detectar más orinas positivas (carriles 1 a 6, panel B). En los carriles 13 y 14 de cada panel se encuentran los controles positivos (*L. borgpetersenii* serovar Hardjo) y sin ADN, respectivamente. MM corresponde al marcador de pesos moleculares.

La aplicación de este método de detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de orina resultó de suma utilidad para el seguimiento de los cultivos microbiológicos que se realizaron en forma paralela con el objetivo de aislar cepas de *Leptospira* spp. a partir de dichas muestras.

4.1.1.3 Aplicación de la PCR convencional para la detección de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de tejido

Alrededor de un 5% de las muestras de tejido procesadas (11/226) fueron positivas para la amplificación del gen *lipL32* (Figura 14), por lo que en 8 de 99 fetos, se confirmó la presencia de especies patógenas de *Leptospira*.

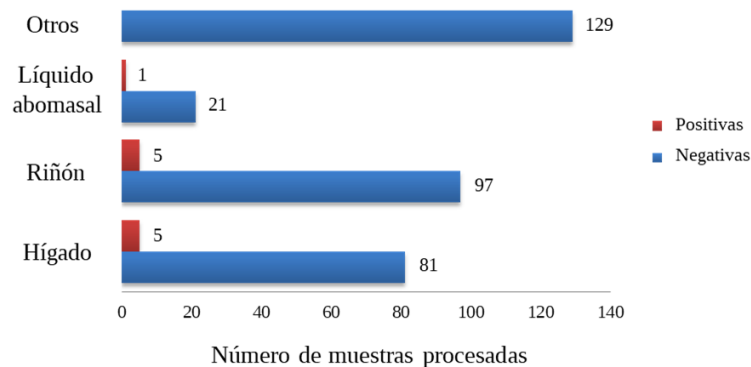


Figura 14. Distribución de reacciones positivas para *lipL32*, discriminadas por tipo de muestra procesada. Dentro de “Otros” se incluyen muestras de placenta, bazo y vejiga, en los cuales no se detectaron reacciones positivas para *lipL32*.

Si bien no se observó efecto inhibitorio sobre la reacción de PCR en ninguno de los tejidos analizados, sí se evidenció un perfil de bandas múltiples en aquellos casos donde el tejido había sido preservado a -20°C previo a su procesamiento. Los tejidos procesados de manera inmediata no mostraron dicho perfil (Figura 15).

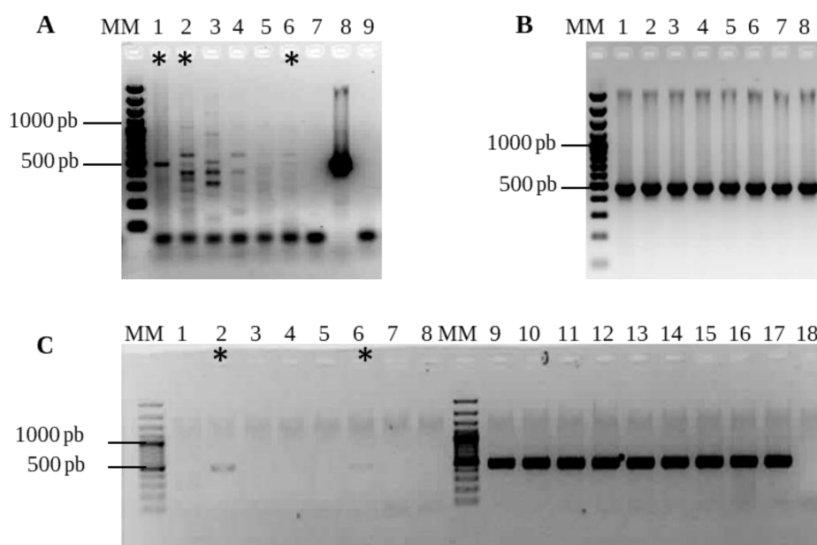


Figura 15. PCR *lipL32* sobre distintas muestras de tejido. Muestras de hígado y riñón conservadas a -20°C (carriles 1 a 7, panel A), y sin congelar (carriles 1 a 8, panel B). Controles de inhibición de muestras en panel A (carriles 1 a 7, panel B) y en panel C (carriles 9 a 16, panel C). Carriles 8 (A, B), y 17 (C), control positivo (*L. borgpetersenii* serovar Hardjo). Carriles 9 (A) y 18 (C), control sin ADN. MM corresponde al marcador de pesos moleculares. Con asterisco se marcan aquellos tejidos en los que se obtuvo PCR positiva para *lipL32*. La presencia de *Leptospira* spp. se confirmó mediante amplificación parcial y secuenciación del gen *rrs*.

4.1.2 Puesta a punto y validación de una PCR en tiempo real

4.1.2.1 Construcción de la curva estándar de ADN

La concentración de ADN obtenido a partir de un cultivo de *L. interrogans* de densidad igual a 10^7 bacterias/mL, fue de 78.4 ng/ μ L. A partir de este ADN se realizaron diluciones seriadas al décimo para la construcción de una curva estándar que fue desde 10^7 a 10^0 leptospiras.

Teniendo en cuenta que un genoma de *Leptospira interrogans* (4.6 Mb) es equivalente a 5 femtogramos de ADN genómico (Bourhy et al., 2011a), se determinaron las correspondencias indicadas en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Correspondencia entre copias genómicas y número de leptospiras.

Tubo	ng/μL	Genomas/μL	Leptospiras
1	78.4	15680000	10^7
2	7.84	1568000	10^6
3	0.784	156800	10^5
4	0.0784	15680	10^4
5	0.00784	1568	10^3
6	0.000784	156.8	10^2
7	0.0000784	15.68	10^1
8	0.00000784	1.568	10^0

Esta curva estándar fue sistemáticamente incluida en cada corrida de PCR, permitiendo determinar la eficiencia de la reacción, así como estimar el número de copias genómicas presentes en una muestra dada.

4.1.2.2 Determinación de la sensibilidad analítica

Los diferentes puntos de la curva estándar se sometieron a la reacción de PCR, obteniéndose un perfil de amplificación como el que se muestra en la **Figura 16**. La curva de amplificación en una PCR en tiempo real representa el cambio de fluorescencia a medida que avanza la reacción, siendo un parámetro importante en la misma el valor de Cq; este parámetro corresponde al primer ciclo dónde se detecta fluorescencia por encima del umbral, y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN, por lo que muestras con mayor concentración presentarán un Cq menor. En el perfil observado para la curva estándar construida se puede evidenciar un patrón constante en el corrimiento del Cq, lo que es esperable, tratándose de diluciones seriadas de un mismo ADN. Esto corrobora la correcta construcción de la curva.

Todos los puntos de la curva fueron realizados por triplicado, en tres ensayos independientes. Si bien todos los puntos de la curva amplificaron, el correspondiente a 1 leptospira evidenció mayor variación tanto a nivel intra-ensayo (réplicas en la misma corrida), como en repeticiones independientes. Debido a esto, se tomó como límite inferior de detección, LOD, 10 leptospiras, equivalentes a aproximadamente 15 genomas, que mostró un comportamiento homogéneo en todas las corridas realizadas. Como se puede apreciar en la **Figura 16**, este inóculo amplifica a un Cq de 31.0 ± 0.5 , por lo que ese valor diferenciará una amplificación positiva de una negativa. No obstante, el valor de Cq puede variar levemente en ± 1 entre ensayos independientes, por lo que se debe determinar para la curva de calibración en cada corrida.

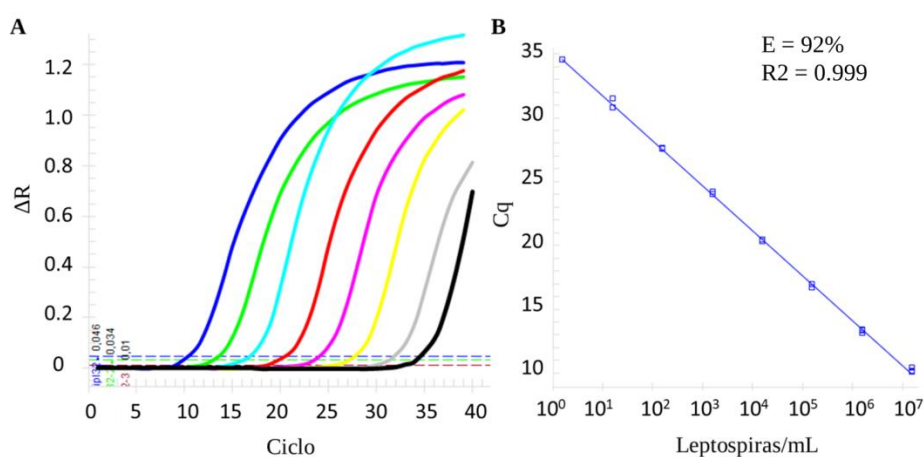


Figura 16. Sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real para *lipL32*. Curva de amplificación para los diferentes inóculos (A): 10⁷ (azul), 10⁶ (verde), 10⁵ (celeste), 10⁴ (rojo), 10³ (magenta), 10² (amarillo), 10¹ (gris), y 10⁰ leptospiras (negro). Curva estándar (B) representando la relación lineal entre el Cq y la densidad bacteriana.

Otros parámetros deben ser tenidos en cuenta en el análisis de un resultado de qPCR de cuantificación absoluta, y entre los más importantes están la eficiencia (E) y la correlación cuadrática R^2 . Ambos se obtienen de la curva representada en la **Figura 16B**, y son indicativos del rendimiento de la reacción. Si bien lo ideal es una eficiencia del 100%, aquellas reacciones con $E \geq 90\%$ son consideradas de buen rendimiento (Svec et al., 2015). Por otra parte, dado que se espera un comportamiento lineal entre cada punto de la curva estándar y su correspondiente C_q , el valor de R^2 debería ser 1, o cercano a la unidad. Para esta corrida en particular, dichos parámetros fueron respectivamente de 92% y 0.999, obteniéndose valores similares para cada una de las PCR realizadas.

Por último, fue necesario corroborar que en cada uno de los puntos de la curva la amplificación obtenida correspondía al producto específico mediante el análisis de la curva de *melting*. En este sentido, únicamente se observó la presencia de producto específico a 76°C, sin formación de dímeros de oligonucleótidos u otros productos inespecíficos (**Figura 17**).

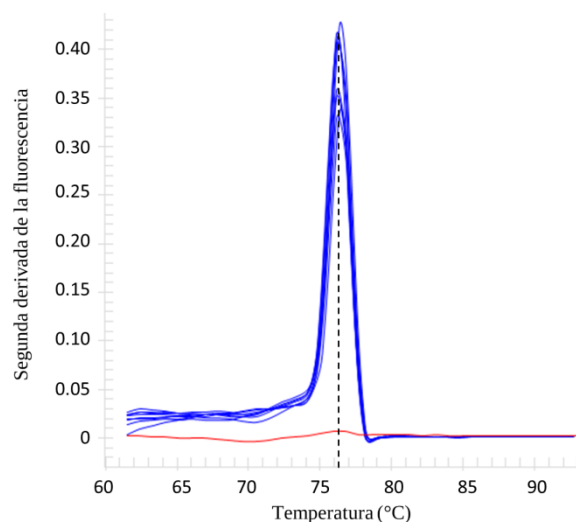


Figura 17. Curva de *melting*. Perfil obtenido para los diferentes puntos de la curva estándar (azul), y control sin molde de ADN (rojo).

4.1.2.3 Determinación de la concentración óptima de control interno de amplificación

Teniendo en cuenta el límite inferior de detección establecido previamente, se ensayaron diferentes concentraciones de control interno, con el fin de determinar el número de copias a incluir por reacción sin que interfiera con la mínima concentración de ADN blanco detectable. Primeramente, empleando las mismas condiciones de ciclado del protocolo a tiempo real, se realizó una PCR a tiempo final para obtener una aproximación del comportamiento de la reacción ante la presencia de

ADN control (*internal ADN control* ó IAC) y así poder elegir la concentración óptima de IAC en relación a la cantidad de ADN blanco. Cabe aclarar que debido a la sensibilidad de la PCR convencional se ensayó una cantidad de ADN blanco de un orden de magnitud superior (100 leptospiras) a la determinada como límite de detección para la qPCR en tiempo real (10 leptopiras). Como se muestra en la **Figura 18** se logró así evidenciar amplificación de ambos productos en tres condiciones distintas, donde la relación de concentraciones entre IAC y ADN blanco fue de 1:1, 10:1 y 100:1, respectivamente. Luego, mediante qPCR se ensayaron las proporciones de IAC:ADN blanco 1:1, 10:1, 100:1 y 1000:1 pero colocando la cantidad de ADN correspondiente al límite de detección del método (equivalente a 10 leptospiras) y se evaluó el perfil de disociación, observándose dos picos a 80 y 83°C para el control interno (**Figura 19**). La aparición de una segunda temperatura de *melting* es indicativo de amplificación de un producto secundario, que claramente está asociado al IAC, ya que cuando se realiza la PCR en ausencia del mismo, el producto de Tm igual a 80°C no es evidenciado (**Figura 19**, panel superior). De acuerdo a lo observado por electroforesis en geles de agarosa (**Figura 18**), se trataría de un producto minoritario, ya que apenas se visualiza mediante tinción con bromuro de etidio. No obstante, los cambios realizados tanto en condiciones de ciclado, como agregado de aditivos en busca de aumentar la especificidad de la reacción, no funcionaron, y este producto continuó siendo amplificado. Se detectó amplificación del IAC y del ADN blanco en las proporciones 1:1 y 10:1 concordantemente a lo observado por PCR convencional (ver recuadros en rojo, **Figuras 18** y **19**) y se observó un fuerte efecto competitivo del IAC que no permitió detectar amplificación del ADN blanco para las proporciones de 100:1 y 1000:1.

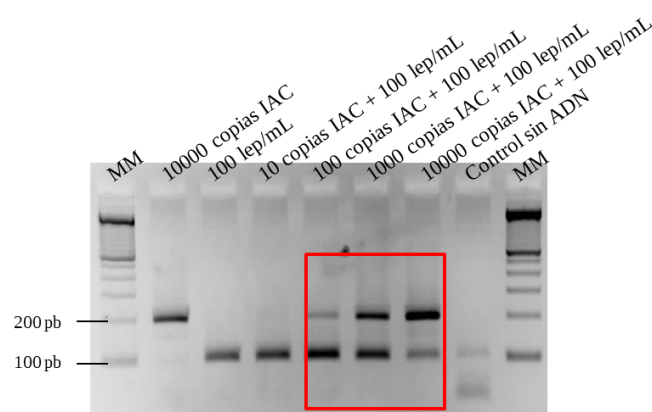


Figura 18. Relación de concentración entre IAC y ADN blanco mediante PCR convencional. Las condiciones de ciclado empleadas fueron las mismas que las utilizadas para qPCR. Se evidenció amplificación de ambos productos en tres condiciones distintas, donde la relación de concentraciones entre IAC y ADN blanco fue de 1:1, 10:1 y 100:1, respectivamente.

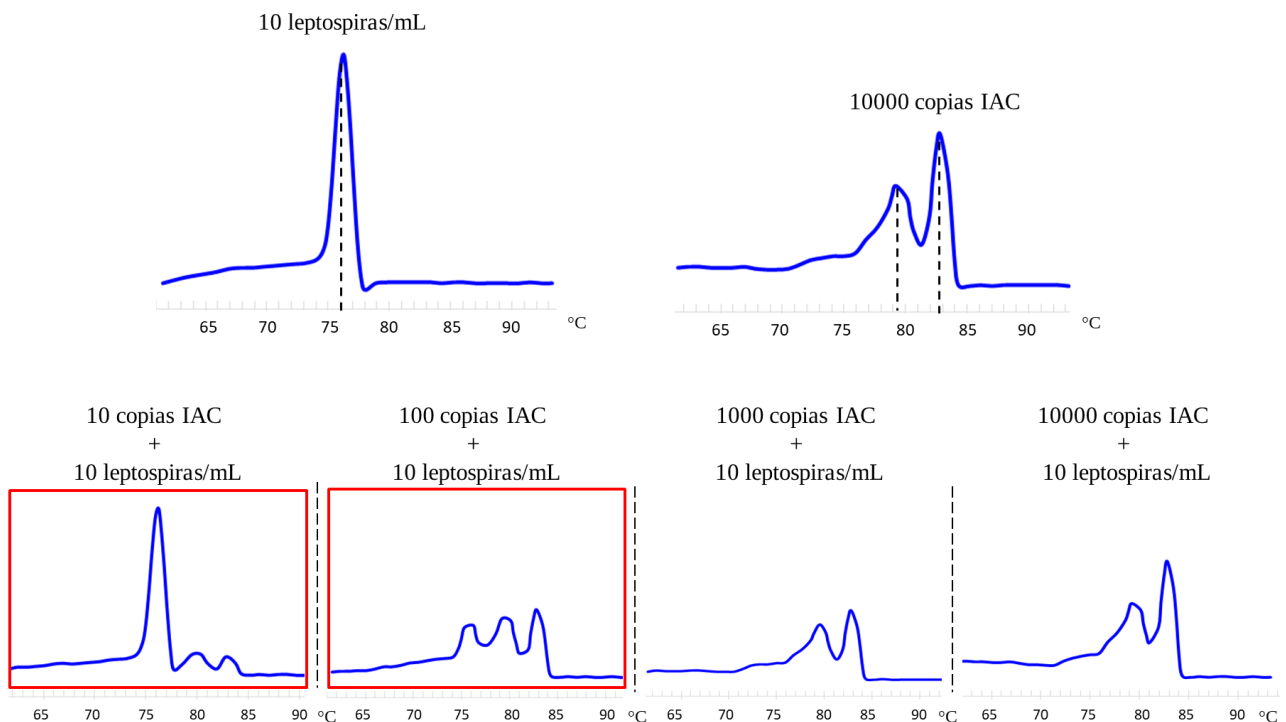


Figura 19. Relación de concentración entre IAC y ADN blanco mediante PCR a tiempo real. El perfil de disociación para el IAC mostró dos picos a aproximadamente 80 y 83 °C. El agregado de IAC al ADN blanco, no modificó la temperatura de melting de este último, presentando su máximo a 76 °C. Se evidenció amplificación de ambos moldes cuando la relación IAC:ADN fue de 1:1 y 10:1.

Si bien fueron dos las concentraciones de control interno a las cuales el límite inferior continuó siendo detectado, para las siguientes reacciones de qPCR se optó por el agregado de 100 copias de IAC/reacción, ya que en estas condiciones el perfil de disociación mostró ser más uniforme en la distribución de los picos, y se evita estar en el límite de detección para dicho control.

4.1.2.4 Evaluación de la especificidad

Al igual que para la PCR a tiempo final, la especificidad de la qPCR fue evaluada frente a diferentes especies del género *Leptospira*, y especies pertenecientes a otros géneros bacterianos (**Figura 20**).

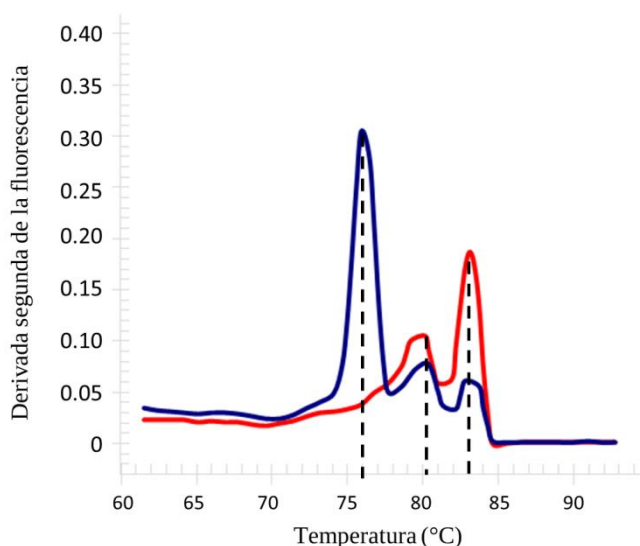


Figura 20. Especificidad de la reacción. El análisis de la curva de disociación para diferentes serovariedades de especies patógenas de *Leptospira* mostró un perfil como el representado en azul, con amplificación del producto específico (76°C), y amplificación del control interno (80 y 83°C). Tanto *L. biflexa* (no patógena), como otras especies de géneros no relacionados a *Leptospira*, presentaron el perfil ejemplificado en rojo, con amplificación únicamente del control interno.

Solamente las especies patógenas de *Leptospira* sp. mostraron amplificación específica para el gen *lipL32*, mientras que especies no patógenas del género, o especies correspondientes a otros géneros bacterianos, no presentaron amplificación detectable adicional al control interno. En la **Figura 21** se muestran los productos de PCR separados por electroforesis en geles de agarosa.

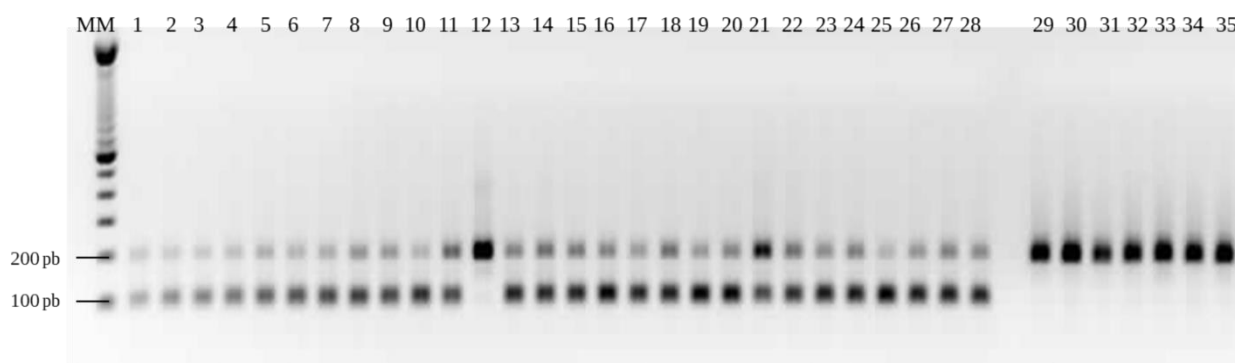


Figura 21. Productos de amplificación por qPCR para diferentes especies. Los números de los carriles se corresponden con el número de especie/cepa de la **Tabla 16**.

A continuación (**Tabla 16**), se resumen las temperaturas de *melting* de los productos de amplificación obtenidos para cada especie/serovar ensayada.

Tabla 16. Temperaturas de *melting* obtenidas para diferentes especies de *Leptospira* y otros géneros bacterianos.

La temperatura de *melting* 1 (Tm1) corresponde al producto específico esperado para el amplicón de *lipL32*, mientras que las temperaturas de *melting* 2 y 3 (Tm2 y Tm3), son las correspondientes al producto de amplificación del control interno.

N° Cepa	Identificación	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
1	<i>L. interrogans</i> sv Australis	76.2	80.1	83.1
2	<i>L. interrogans</i> sv Autumnalis	76.5	80.4	83.4
3	<i>L. interrogans</i> sv Bataviae	76.2	80.1	83.1
4	<i>L. interrogans</i> sv Canicola	76.2	80.1	83.4
5	<i>L. borgpetersenii</i> sv Castellonis	76.8	80.1	83.4
6	<i>L. kirschneri</i> sv Cynopteri	76.5	80.1	83.4
7	<i>L. kirschneri</i> sv Grippytyphosa	76.2	80.1	83.4
8	<i>L. borgpetersenii</i> sv Hardjo	76.8	80.1	83.4
9	<i>L. interrogans</i> sv Hebdomadis	76.2	80.1	83.4
10	<i>L. interrogans</i> sv Copenhageni	76.2	80.1	83.1
11	<i>L. noguchii</i> sv Panama	76.2	80.1	83.4
12	<i>L. biflexa</i> sv Patoc	-	79.8	83.4
13	<i>L. interrogans</i> sv Pomona	76.2	80.1	83.1
14	<i>L. interrogans</i> sv Pyrogenes	76.2	80.1	83.4
15	<i>L. borgpetersenii</i> sv Sejroe	76.8	80.1	83.4
16	<i>L. borgpetersenii</i> sv Tarassovi	76.8	80.1	83.1
17	<i>L. interrogans</i> sv Ictero	76.2	80.1	83.4
18	<i>L. weilii</i> sv Celledoni	76.5	80.1	83.4
19	<i>L. interrogans</i> sv Djasiman	76.5	80.4	83.4
20	<i>L. borgpetersenii</i> sv Mayotte	76.8	80.1	83.4
21	<i>L. weilii</i> sv Sarmin	78.3	80.1	83.4
22	<i>L. santarosai</i> sv Shermani	76.5	80.1	83.4
23	<i>L. borgpetersenii</i> sv Javanica	77.1	80.4	83.4
24	<i>L. noguchii</i> sv Louisiana	76.5	80.4	83.7
25	<i>L. interrogans</i> sv Hardjo	76.5	80.4	83.7
26	<i>L. interrogans</i> sv Bratislava	76.5	80.4	83.7
27	<i>L. interrogans</i> sv Wolfii	76.5	80.4	83.4
28	<i>L. kirschneri</i> sv Mozdok	76.5	80.4	83.4
29	<i>E. coli</i>	-	79.8	83.1
30	<i>P. aeruginosa</i>	-	79.8	83.4
31	<i>S. aureus</i>	-	79.8	83.4
32	<i>Enterococcus</i> sp.	-	79.8	83.1
33	<i>Salmonella</i> sp.	-	79.8	83.4
34	<i>Leptonema</i> sp.	-	80.1	83.4
35	<i>L. biflexa</i>	-	79.8	83.4

4.1.2.5 Aplicación del protocolo de qPCR para la detección de ADN específico de especies patógenas de *Leptospira* en muestras biológicas

De las 32 muestras de ADN analizadas, 5 resultaron positivas para *lipL32* (Figura 22). En el resto de las muestras analizadas únicamente se observó amplificación del control de inhibición (Tabla 17).

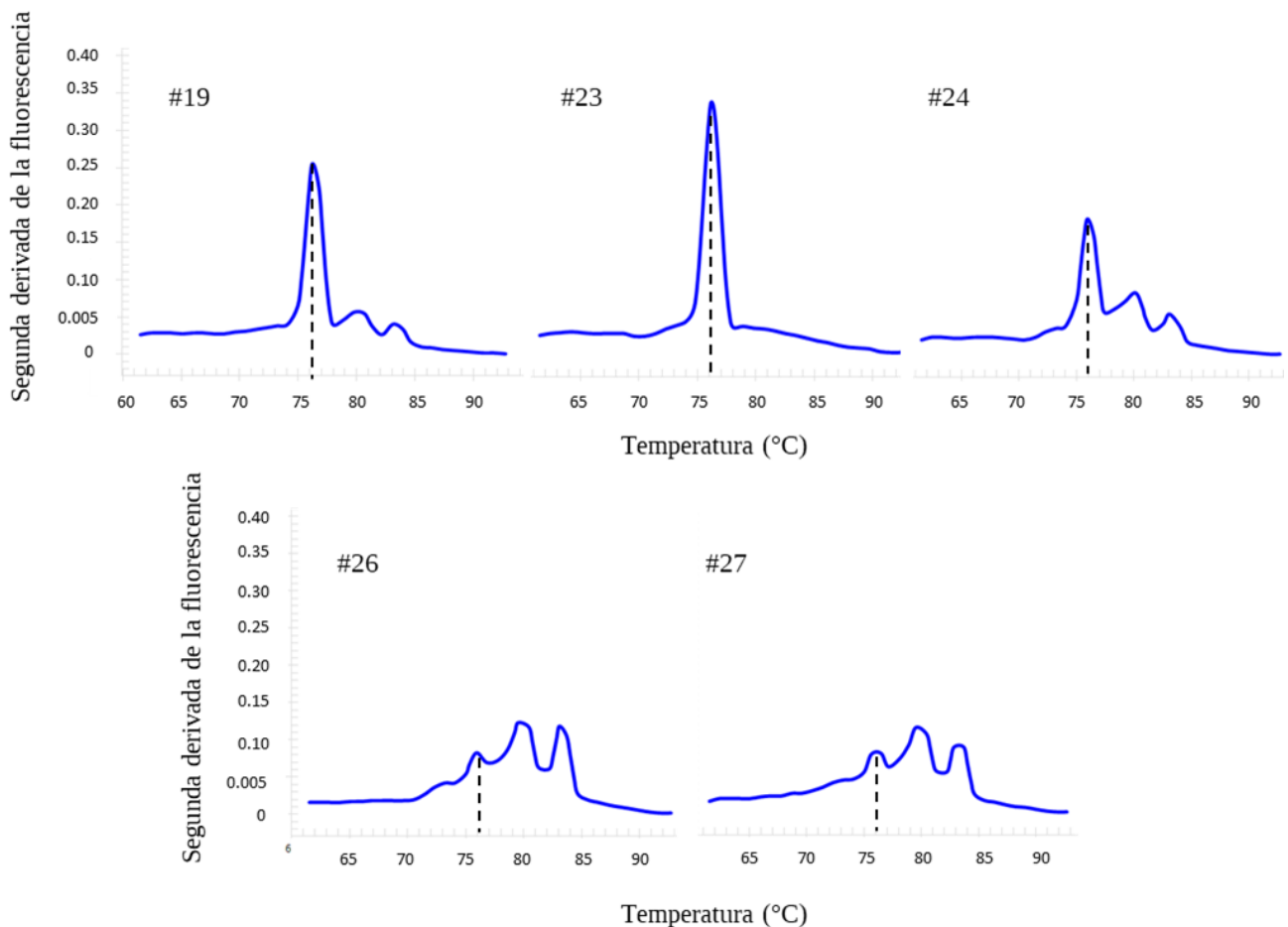


Figura 22. Amplificación de *lipL32* en muestras de riñones de jabalí. La identificación ubicada en el margen superior izquierdo de cada gráfico se corresponde con el ID Muestra de la **Tabla 16**. En todas las muestras en las que se amplificó el gen *lipL32* se confirmó la presencia de ADN de *L. interrogans* mediante amplificación y secuenciación parcial del gen *rrs*.

Tabla 17. Valores de Cq y temperaturas de *melting* para las diferentes muestras de riñón de jabalí ensayadas. Cada muestra fue realizada por triplicado. Tm1 corresponde al producto específico esperado para el amplicón del gen *lipL32*; Tm2 y Tm3, corresponden al producto de amplificación del control interno. En amarillo se destacan las muestras en las que se detectó ADN específico de especies patógenas de *Leptospira*.

ID Muestra	Cq \pm Δ Cq	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
1	33.4 \pm 0.3	-	79.8	83.4
2	31.4 \pm 0.6	-	79.9	83.3
3	31.5 \pm 0.8	-	79.9	83.2
4	30.6 \pm 0.4	-	79.8	83.2
5	34 \pm 1	-	79.8	83.3
6	31.3 \pm 0.8	-	79.9	83.4
7	33.8 \pm 0.7	-	80	83.4
8	33.5 \pm 0.4	-	80.1	83.4
9	32 \pm 1	-	79.8	83.1
10	32.6 \pm 0.3	-	79.7	83.1
11	31.1 \pm 0.1	-	79.8	83.2
12	30.9 \pm 0.7	-	79.8	83.2
13	31.5 \pm 0.4	-	79.9	83.3
14	33.2 \pm 0.4	-	79.8	83.1
15	30.6 \pm 0.3	-	79.8	83.2
16	29.5 \pm 0.6	-	80	83.3
17	31.3 \pm 0.3	-	80	83.3
18	32.9 \pm 0.3	-	80	83.4
19	28.7 \pm 0.4	76.4	80.1	83.4
20	32.7 \pm 0.2	-	80	83.3
21	31 \pm 1	-	79.8	83.3
22	35.9 \pm 0.1	-	79.8	83.1
23	22.9 \pm 0.1	76.2	-	-
24	30.2 \pm 0.8	76.2	80	83.3
25	30.3 \pm 0.8	-	80	83.3
26	30.5 \pm 0.9	76	79.8	83.3
27	33 \pm 1	76.2	80	83.4
28	29.9 \pm 0.1	-	79.8	83.3
29	30.6 \pm 0.4	-	80	83.4
30	30.3 \pm 0.3	-	80.1	83.4
31	32.9 \pm 0.4	-	79.8	83.3
32	31.2 \pm 0.1	-	79.9	83.3

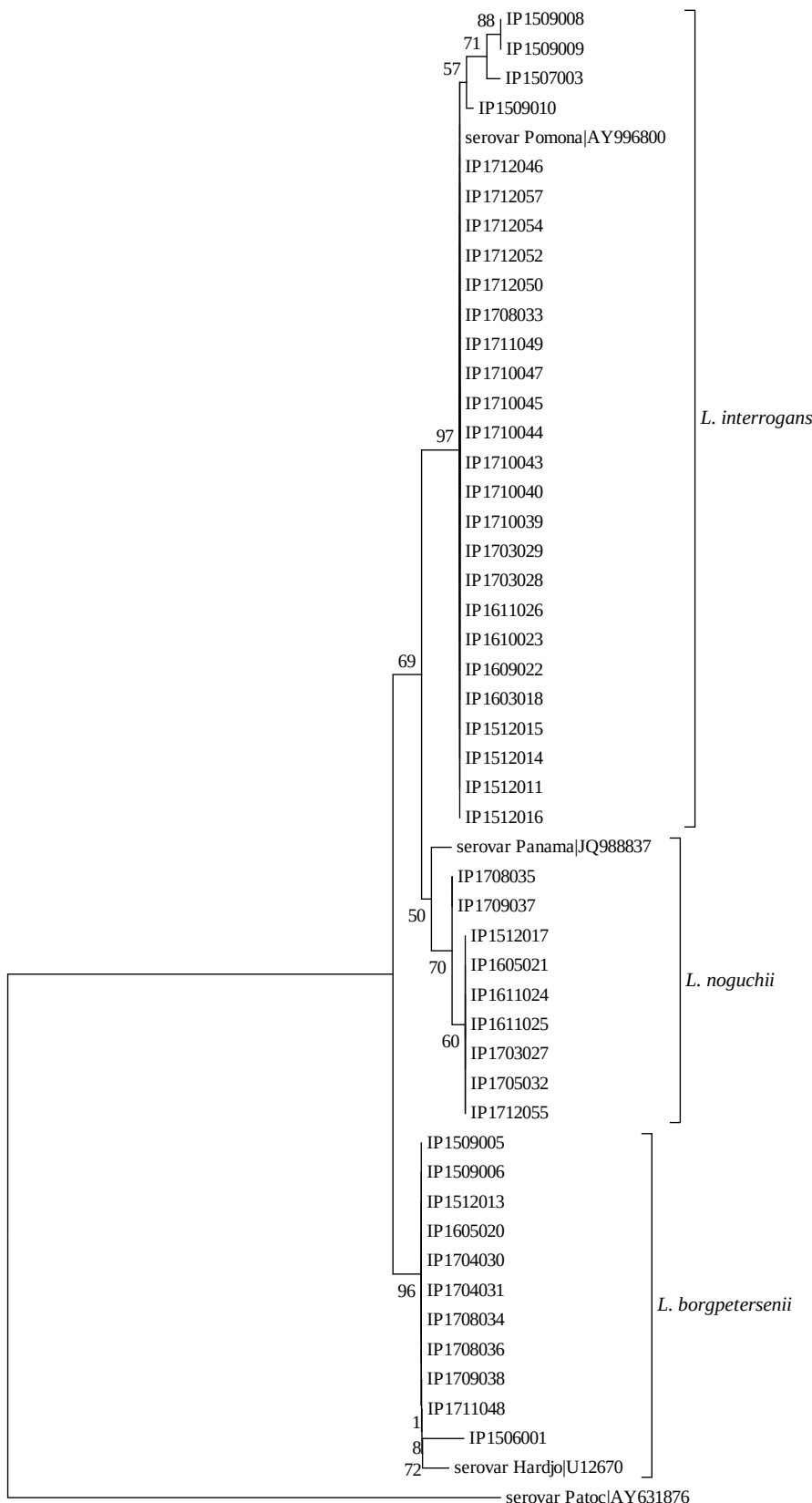
Considerando el valor de Cq promedio para los puntos de la curva estándar, se estimó la carga bacteriana para cada muestra positiva (**Tabla 18**). La eficiencia de reacción obtenida en cada ensayo independiente (n = 3) superó el 98%, y el R² promedió 0.99, reflejando el buen rendimiento de las distintas PCR.

Tabla 18. Estimación de carga bacteriana en muestras positivas. El valor de Cq promedio para los diferentes puntos de la curva fue obtenido a partir de tres ensayos independientes.

	Cq \pm ΔCq	Leptospiras
Curva estándar	22.2 \pm 0.1	10 ⁴
	26.1 \pm 0.1	10 ³
	29.2 \pm 0.5	10 ²
	32.6 \pm 0.3	10 ¹
Jabalí 19	28.7 + 0.4	10 ²
Jabalí 23	22.9 + 0.1	10 ⁴
Jabalí 24	30.2 + 0.8	10 ²
Jabalí 26	30.5 + 0.9	10 ²
Jabalí 27	33 + 1	10 ¹

4.2 Aplicación de métodos moleculares y serológicos para tipificar aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp.

4.2.1 Asignación de especie: amplificación y secuenciación parcial del gen *rrs*



De los 47 aislamientos obtenidos, 27 pertenecieron a la especie *L. interrogans*, 11 a *L. borgpetersenii* y 9 a *L. noguchii* (Figura 23).

Figura 23. Análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen *rrs*. Los aislamientos autóctonos se indican con su código IP. Las secuencias utilizadas como referencia de cada especie (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*), así como el grupo control (*L. biflexa*) están acompañadas de su código de acceso (*GenBank*). El análisis se realizó empleando el método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei. El soporte de cada clado se validó generando 1000 réplicas mediante la técnica Bootstrap.

4.2.2 Determinación de serogrupo: test de microaglutinación

Todos los aislamientos pertenecientes a la especie *L. borgpetersenii* presentaron aglutinación positiva con sueros reactivos al serogrupo Sejroe. Los agrupados dentro de la especie *L. interrogans*, en su mayoría, exhibieron reactividad a sueros contra el serogrupo Pomona, a excepción de 1 aislamiento que fue positivo para el serogrupo Canicola. Por último, los aislamientos de *L. noguchii* desplegaron una notable variabilidad, reaccionando ante sueros contra el serogrupo Autumnalis, Pyrogenes y Australis. Más aun, tres de los aislamientos de *L. noguchii* no reaccionaron con ninguno de los 24 sueros presentes en el panel de referencia, por lo que no fue posible asignarles identidad a nivel de serogrupo (podrían tratarse de un nuevo(s) serogrupo(s), o al menos no ser representantes de los serogrupos más habituales a nivel mundial). En la **Tabla 19** se detallan los títulos de aglutinación para cada una de las cepas aisladas.

Tabla 19. Determinación de serogrupo para aislamientos autóctonos.

	ID Cepa	Serogrupo (título antisuero de referencia)	ID Cepa	Serogrupo (título)
<i>L. borgpetersenii</i>	IP1506001	Sejroe (6400)	IP1704031	Sejroe (3200)
	IP1509005	Sejroe (3200)	IP1708034	Sejroe (3200)
	IP1509006	Sejroe (6400)	IP1708036	Sejroe (3200)
	IP1512013	Sejroe (3200)	IP1709038	Sejroe (3200)
	IP1605020	Sejroe (1600)	IP1711048	Sejroe (3200)
	IP1704030	Sejroe (3200)		
<i>L. interrogans</i>	IP1507003	Pomona (1600)	IP1708033	Pomona (1600)
	IP1509008	Pomona (1600)	IP1710039	Pomona (1600)
	IP1509009	Pomona (1600)	IP1710040	Pomona (800)
	IP1509010	Pomona (3200)	IP1710043	Pomona (1600)
	IP1512011	Pomona (1600)	IP1710044	Pomona (800)
	IP1512014	Pomona (800)	IP1710045	Pomona (1600)
	IP1512015	Pomona (800)	IP1710046	Pomona (3200)
	IP1512016	Pomona (3200)	IP1710047	Pomona (1600)
	IP1603018	Pomona (1600)	IP1711049	Canicola (800)
	IP1609022	Pomona (3200)	IP1712050	Pomona (1600)
	IP1610023	Pomona (3200)	IP1712052	Pomona (1600)
	IP1611026	Pomona (1600)	IP1712054	Pomona (1600)
	IP1703028	Pomona (1600)	IP1712057	Pomona (800)
	IP1703029	Pomona (1600)		
<i>L. noguchii</i>	IP1512017	No reactivo	IP1705032	Autumnalis (800)
	IP1605021	Pyrogenes (800)	IP1708035	Autumnalis (800)
	IP1611024	Australis (800)	IP1709037	Autumnalis (1600)
	IP1611025	Autumnalis (800)	IP1712055	No reactivo
	IP1703027	No reactivo		

4.2.3 Inferencia de serovar: amplificación de alelos VNTR

Mediante esta técnica sólo se pudo tipificar aquellas cepas pertenecientes a las especies *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*, ya que se encuentra validada para estas especies y para *L. kirschneri* (Salaün et al., 2006). La amplificación de los alelos VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10 para las cepas de la especie *L. interrogans* serogrupo Pomona, presentó un perfil de repeticiones compatible con serovar Kennewicki: el número de repetidos para cada alelo fue de 4 (ó 5), 1 y 10, respectivamente, siendo el patrón esperado para dicho serovar 5-0-10. La cepa *L. interrogans* serogrupo Canicola exhibió un perfil distinto: 1-10-2, compatible con el serovar Canicola (perfil esperado 1-10-3) (Figura 24A).

Los alelos VNTR-10, VNTR-Lb4 y VNTR-Lb5, mostraron el mismo patrón de amplificación para todos los aislamientos pertenecientes a la especie *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe, con 1, 5 (ó 4) y 4 repeticiones para cada alelo respectivamente, correspondiéndose con el perfil esperado para el serovar Hardjo (1-5-4) (Figura 24B).

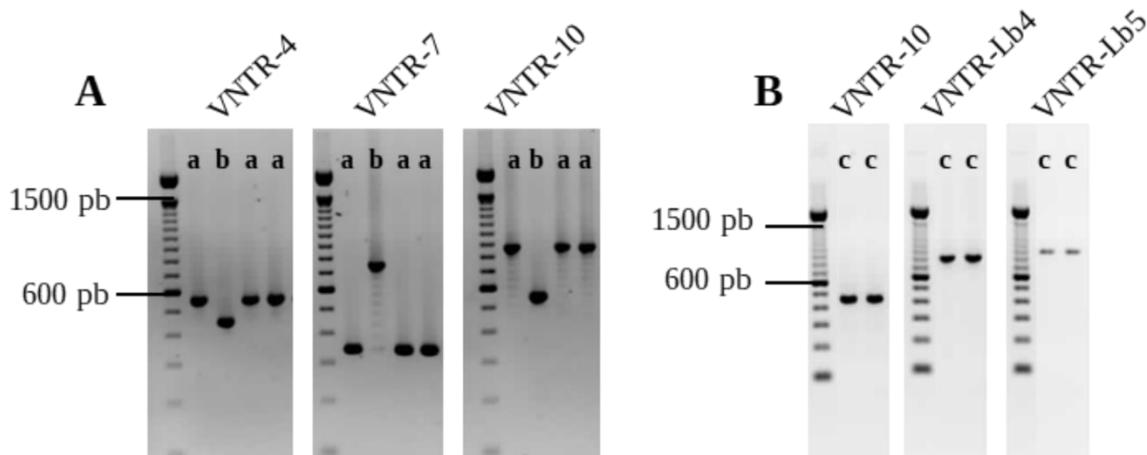


Figura 24. Perfil VNTR para cepas aisladas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. Perfil de amplificación para los alelos VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10 (A), de *L. interrogans* serogrupo Pomona (a) y de *L. interrogans* serogrupo Canicola (b). Perfil de amplificación para los alelos VNTR-10, VNTR-Lb4 y VNTR-Lb5 (B), de *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe (c).

Tomando en su conjunto los datos relativos a la especie (secuenciación parcial del gen *rrs*), serogrupo (MAT) y serovar (amplificación de alelos VNTR), la identificación de los aislamientos autóctonos se distribuye tal como se muestra en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Identificación de cepas circulantes a nivel nacional.

Especie	Serogrupo	Serovar presuntivo	N° de aislamientos
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	11
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Kennewicki	26
	Canicola	Canicola	1
<i>L. noguchii</i>	Australis	ND	1
	Autumnalis	ND	4
	Pyrogenes	ND	1
	ND	ND	3

ND = No determinado

4.2.4 Genotipificación mediante amplificación y secuenciación parcial del gen *secY*

Los aislamientos identificados dentro de la especie *L. interrogans* presentaron el mismo alelo *secY* (alelo 6), compartido entre los serovares Kennewicki y Canicola. El serovar Pomona que ha sido analizado en trabajos de otros laboratorios, de hecho también presenta el mismo alelo (Zarantonelli et al., 2018) (**Figura 25**).

Las cepas de *L. borgpetersenii* exhibieron un mismo alelo también (el alelo *secY* 47), con un 100% de identidad respecto a su equivalente en cepas de referencia de serovar Hardjo.

Los aislamientos de *L. noguchii* en cambio, que ya habían manifestado ser muy variables a nivel de serogrupo, reforzaron dicha heterogeneidad, pues ninguno exhibió alelos de *secY* reportados en la base de datos Pub-MLST. Es más, combinando la información de serogrupo, con el

secuenciotipado del gen *secY*, es altamente probable que los 9 aislados correspondan a serovares diferentes.

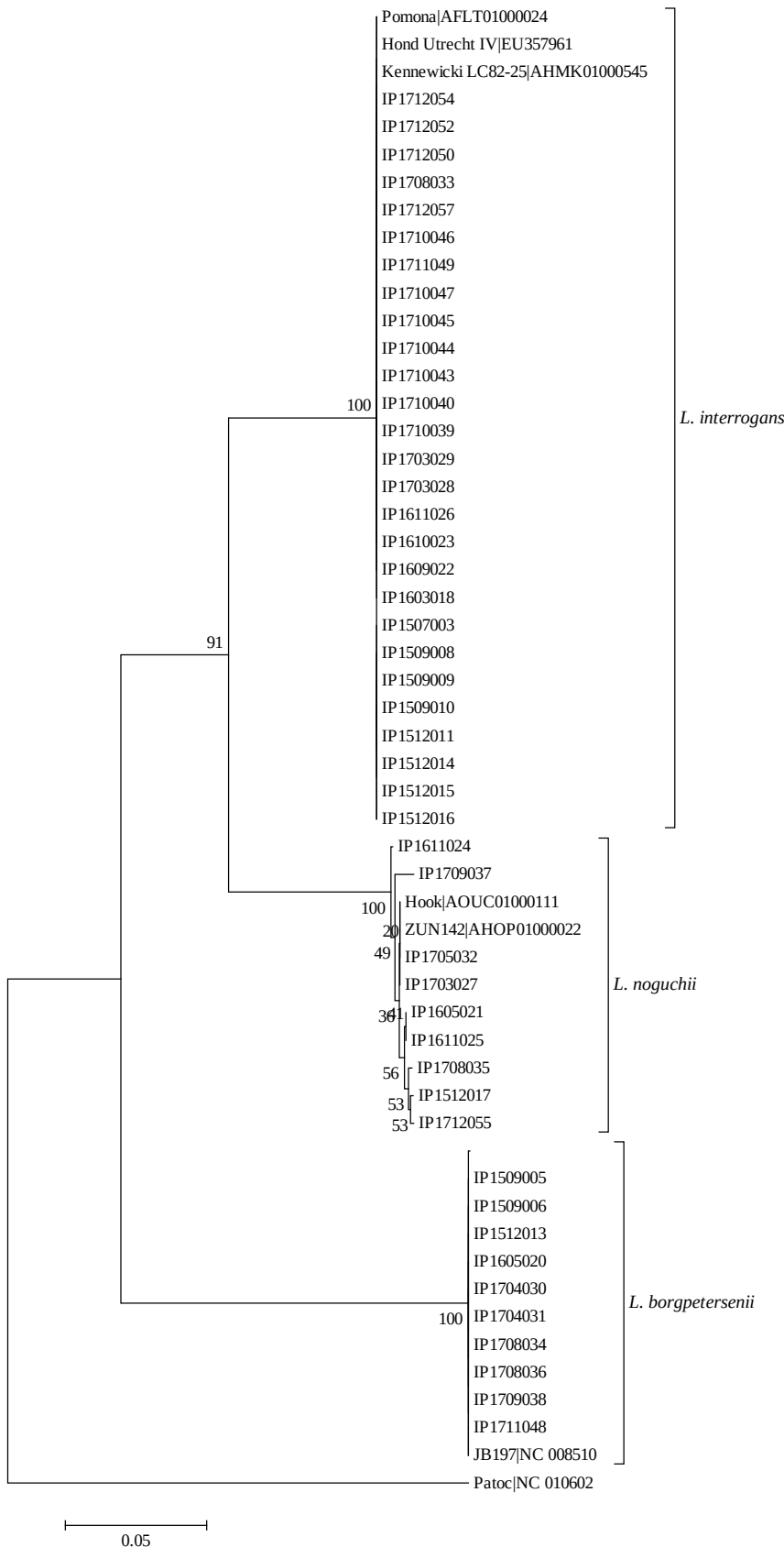


Figura 25. Análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen *secY*. Los aislamientos autóctonos se indican con su código IP. Las secuencias utilizadas como referencia para cada especie (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*), así como el grupo control (*L. biflexa*) están acompañadas de su *Accession Number* (*GenBank*). Las cepas Pomona y Kennewicki corresponden al serovar Pomona; Hond Utrecht IV al serovar Canicola; Hook al serovar Australis; ZUN142 al serovar Autumnalis; y JB197 pertenece al serovar Hardjo. El análisis se realizó empleando el método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei. El soporte de cada clado se validó generando 1000 réplicas mediante la técnica Bootstrap.

Los diferentes genotipos *secY* determinados para los aislamientos se resumen en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Genotipo *secY* para los diferentes aislamientos.

Especie	Serogrupo	Serovar presuntivo/Cepa	Genotipo <i>secY</i>	
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Kennewicki	A	
	Canicola	Canicola		
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	B	
	ND	IP1512017	C	
	Pyrogenes	IP1605021	D	
	Australis	IP1611024	E	
	Autumnalis	IP1611025	D	
	<i>L. noguchii</i>	ND	IP1703027	F
		Autumnalis	IP1705032	F
		Autumnalis	IP1708035	G
		Autumnalis	IP1709037	H
	ND	IP1712055	I	

ND = no determinado

4.3 Secuenciación de genomas completos

4.3.1 Análisis de calidad de los genomas ensamblados

En el marco de este trabajo de tesis se secuenciaron mediante aplicación de la tecnología Illumina los primeros 40 genomas completos de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. recuperados mediante cultivo microbiológico de muestras de bovinos infectados en Uruguay. Luego de evaluar la calidad de los datos crudos de secuenciación, y eliminar secuencias adaptadoras y lecturas de mala calidad, se procedió al ensamblado de los genomas.

En suma, se secuenciaron, ensamblaron y anotaron un total de 40 genomas, distribuidos en 21 aislamientos representativos de la especie *L. interrogans*, 11 de *L. borgpetersenii* y 8 de *L. noguchii*. La calidad de cada genoma ensamblado fue categorizada en dos grupos (**Tabla 22**) de acuerdo a: i) número de *contigs*, es decir, número de secuencias consenso obtenidas a partir del ensamblaje inicial de las lecturas resultantes de la secuenciación; ii) valor N50, esto es, una vez que los *contigs* son ordenados de mayor a menor, dicho valor se corresponde con el tamaño del *contig* más pequeño necesario para cubrir el 50% del genoma; iii) y valor L50, correspondiente al número de *contigs* que representan ese 50%. Cuanto menor es el número de *contigs* finales (menos fragmentación del genoma), mayor el valor N50 (*contigs* más grandes), y menor el L50 (pocos fragmentos necesarios para cubrir la mitad del genoma), mejor es la calidad del ensamblaje obtenido.

Tabla 22. Criterio utilizado para la categorización de la calidad de los genomas ensamblados.

	N° de <i>contigs</i>	N50	L50
Óptima	≤ 450	≥ 16000	≤ 90
No óptima	> 450	< 16000	> 90

De acuerdo a dichos criterios de calidad de ensamblajes, la **Tabla 23** detalla los resultados obtenidos para cada genoma obtenido en este trabajo de Tesis.

Tabla 23. Calidad de los genomas obtenidos. Se remarcan de acuerdo a los criterios de calidad y esquema de colores de la Tabla 22.

	ID Cepa	N° contigs	N50	L50		ID Cepa	N° contigs	N50	L50
<i>L. borgpetersenii</i>	IP1506001	221	35794	28	<i>L. noguchii</i>	IP1512017	738	12472	120
	IP1509006	178	31998	40		IP1605021	686	15364	95
	IP1512012	271	35480	30		IP1611024	596	8518	153
	IP1512013	230	36128	29		IP1611025	644	9970	138
	IP1605020	187	32208	35		IP1703027	518	9345	142
	IP1704030	182	39424	28		IP1705032	309	33876	44
	IP1704031	181	39357	27		IP1708035	336	30263	46
	IP1708034	180	44974	26		IP1709037	321	32980	45
	IP1708036	183	44802	27					
	IP1709038	183	40519	27					
	IP1711048	189	41682	29					
	<i>L. interrogans</i>	IP1507003	377	39552		38	<i>L. interrogans</i>	IP1611026	487
IP1509008		236	38685	37	IP1703028	492		11870	118
IP1509009		257	40250	36	IP1703029	510		12785	108
IP1509010		384	17755	82	IP1710039	154		57029	23
IP1512011		409	42229	31	IP1710040	166		56454	27
IP1512014		245	41894	31	IP1710043	153		57793	25
IP1512015		228	41872	31	IP1710044	166		58327	25
IP1512016		220	49707	29	IP1710045	161		56843	26
IP1603018		577	10027	136	IP1710046	165		57796	26
IP1609022		492	11796	115	IP1710047	161		62920	23
IP1610023		540	10222	127					

4.3.2 Anotación de genomas

La anotación de los genomas permitió determinar el tamaño del genoma para cada cepa secuenciada, así como el número de secuencias codificantes (CDS), genes de ARN de transferencia y genes de ARN ribosomal (Tabla 24).

Tabla 24. Características generales de los genomas secuenciados. Se remarcan de acuerdo a los criterios de calidad y esquema de colores de la Tabla 22.

	ID Cepa	Tamaño (pb)	N° contigs	CDS	ARNt	ARNr
<i>L. borgpetersenii</i>	IP1506001	3,739,239	221	3367	38	3
	IP1509006	3,677,079	178	3359	38	3
	IP1512012	3,736,499	271	3399	38	3
	IP1512013	3,702,856	230	3359	38	3
	IP1605020	3,706,144	187	3329	38	3
	IP1704030	3,720,497	182	3393	38	3
	IP1704031	3,715,408	181	3391	38	3
	IP1708034	3,713,004	180	3384	38	3
	IP1708036	3,715,392	183	3389	38	3
	IP1709038	3,744,015	183	3378	38	3
	IP1711048	3,717,002	189	3394	38	3
<i>L. interrogans</i>	IP1507003	4,585,042	377	3621	37	3
	IP1509008	4,535,897	236	3595	37	3
	IP1509009	4,555,583	257	3615	37	3
	IP1509010	4,361,379	384	3525	37	3
	IP1512011	4,620,672	409	3638	37	3
	IP1512014	4,543,074	245	3605	37	3
	IP1512015	4,536,158	228	3601	37	3
	IP1512016	4,533,052	220	3588	37	3
	IP1603018	3,886,820	577	3195	30	3
	IP1609022	4,098,145	492	3333	36	3
	IP1610023	4,023,824	540	3294	31	3
	IP1611026	4,093,233	487	3338	35	3
	IP1703028	3,965,558	492	3234	36	3
	IP1703029	4,133,533	510	3357	35	3
	IP1710039	4,533,420	154	3598	37	3
	IP1710040	4,532,161	166	3602	37	3
	IP1710043	4,532,266	153	3601	37	3
IP1710044	4,531,130	166	3596	37	3	
IP1710045	4,528,811	161	3600	37	3	
IP1710046	4,528,712	165	3588	37	3	
IP1710047	4,533,606	161	3598	37	3	
<i>L. noguchii</i>	IP1512017	4,553,560	738	3735	37	3
	IP1605021	4,755,210	686	3856	37	3
	IP1611024	3,992,730	596	3234	35	3
	IP1611025	4,288,978	644	3580	35	3
	IP1703027	3,865,680	518	3167	36	3
	IP1705032	4,605,018	309	3688	37	3
	IP1708035	4,570,700	336	3644	38	3
IP1709037	4,612,893	321	3743	38	3	

4.3.3 Análisis genómico

4.3.3.1 Pangenoma

El alineamiento de los genomas completos y posterior determinación del valor de ANI, permitió confirmar el agrupamiento de que aquellas cepas previamente catalogadas dentro de la misma especie en base a secuenciación parcial del gen *rrs* (**Tabla 25**).

Tabla 25. Average Nucleotide Identity (ANI) entre las diferentes especies secuenciadas. El ANI se encuentra representado en puntos porcentuales. Cepas con ANI \geq 95% pertenecen a la misma especie.

	<i>L. interrogans</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. noguchii</i>
<i>L. interrogans</i>	99-100	80-81	90-91
<i>L. borgpetersenii</i>		99-100	81-82
<i>L. noguchii</i>			99-100

Analizando la composición génica global fue posible determinar el número de genes constituyentes del pangenoma a nivel de género, ubicándose aproximadamente en el entorno de 8000; tan sólo un 15% de estos genes se encuentran conservados en los 40 genomas analizados (**Figura 26**).

El análisis del pangenoma por especie, muestra un acervo genético más conservado a nivel de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*, evidenciado por la meseta alcanzada en el número de genes constituyentes del mismo, mientras que para *L. noguchii* la diversidad genética parece ser mucho mayor, ya que tras el agregado de nuevos genomas, continúan apareciendo nuevos genes, configurando lo que se denomina un perfil de pangenoma abierto (**Figura 27**).

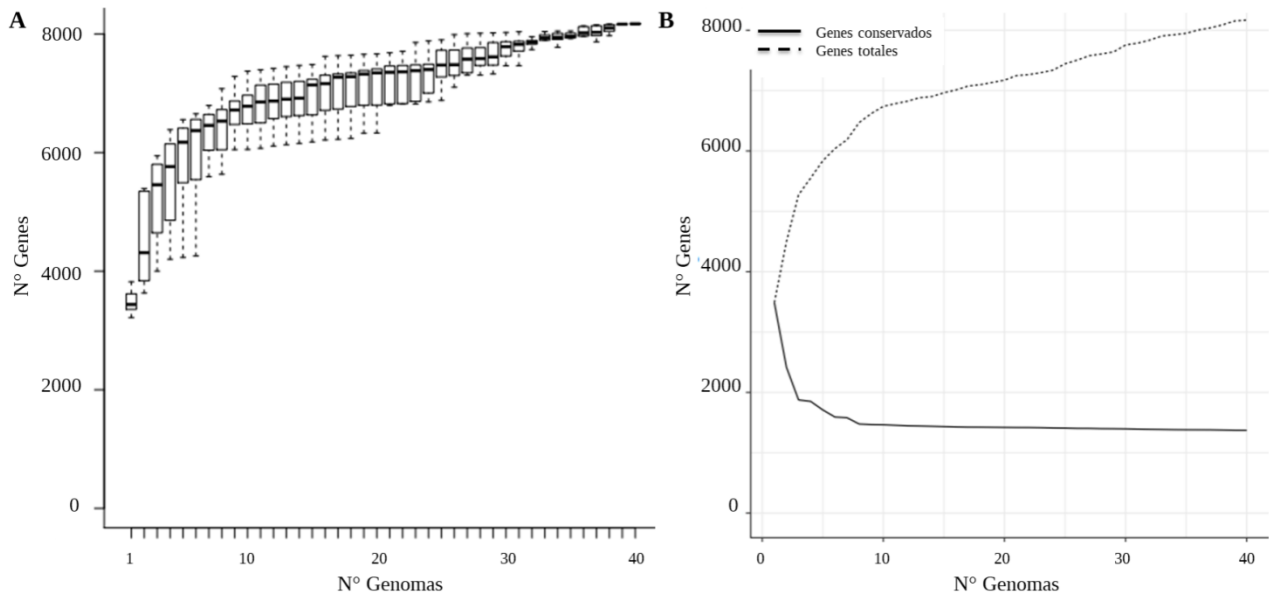


Figura 26. Número de genes constituyentes del pangenoma a nivel del género *Leptospira* incluyendo todos los aislamientos secuenciados. Aproximadamente 8000 genes componen el pangenoma de las 40 cepas secuenciadas (A), mientras que menos de la cuarta parte compone el genoma *core* (B).

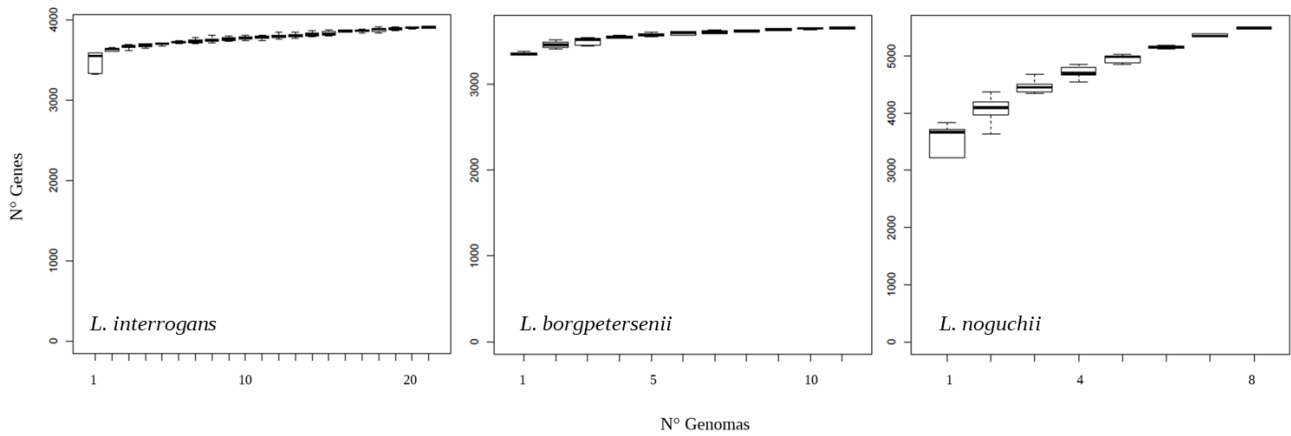


Figura 27. Número de genes constituyentes del pangenoma en cada especie secuenciada.

4.3.3.2 Genoma accesorio

A partir del análisis del pangenoma a nivel de género se pudo determinar un subgrupo de genes presentes de manera diferencial dentro de cada serogrupo identificado (**Figura 28**). Es notable señalar la gran cantidad de genes encontrados codificando para proteínas hipotéticas, sobre todo en la mayoría de las cepas de *L. noguchii*.

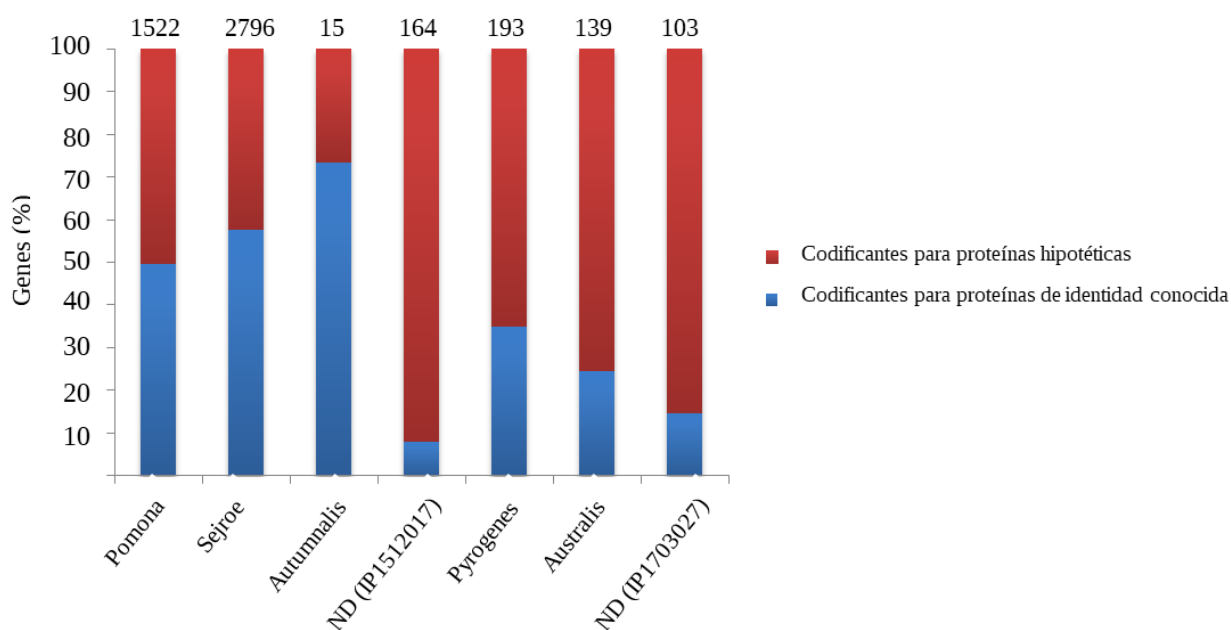


Figura 28. Distribución de genes únicos presentes por serogrupo secuenciado. En la parte superior se especifica el número total de genes únicos encontrados dentro de cada serogrupo.

Además de esta distribución de determinantes genéticos específica de serogrupo, un total de 1605 genes fueron encontrados únicamente en aislamientos individuales (ausentes en los restantes 39), siendo el 78% de dichos genes codificantes para proteínas de función desconocida (**Tabla A.1**). Dentro del porcentaje restante se pudo evidenciar un gran número que codifica para enzimas modificadoras de azúcares, lo cual es sumamente relevante desde el punto de vista de generación de variabilidad a nivel del antígeno O.

4.3.3.3 Genoma central

El alineamiento de los genomas empleando únicamente aquellos genes compartidos por todos los aislamientos, dejó en evidencia cierta variabilidad dentro de las cepas pertenecientes al mismo serovar (**Figura 29**). Es de esperarse que las mutaciones responsables de esta variación no estén afectando en gran medida el LPS, y por eso no se refleje en un cambio de serovariedad.

Dentro de los genes pertenecientes al genoma *core*, fue posible distinguir aquellos codificantes para proteínas ribosomales, flagelares, muchas proteínas con funciones metabólicas y otras funciones esenciales, tales como la respiración celular (**Tabla A.2**). A diferencia del genoma accesorio donde la mayoría de los genes codifican para proteínas hipotéticas, en el genoma compartido únicamente el 16% pertenecen a este grupo.

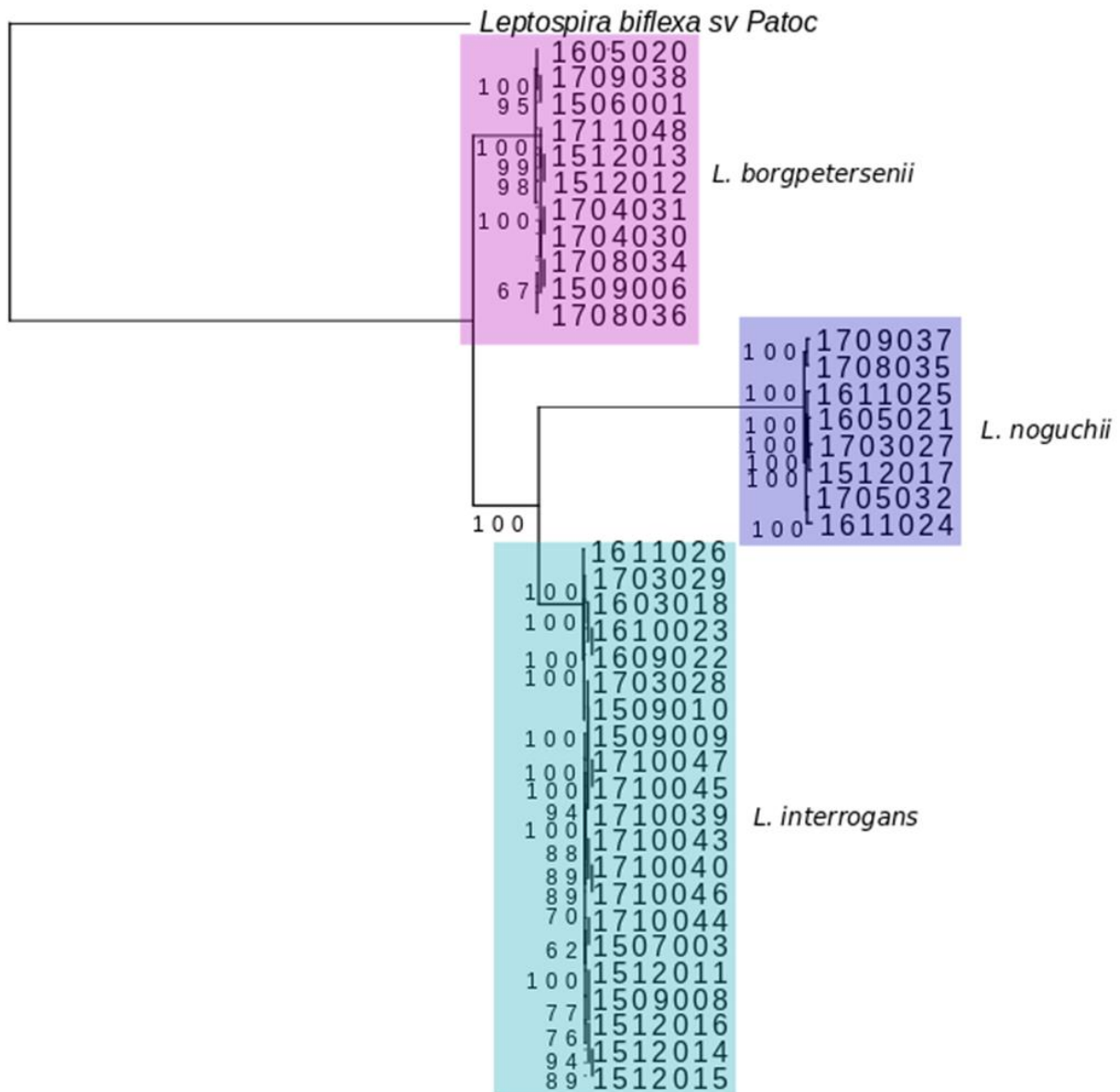


Figura 29. Análisis filogenético de los aislamientos basándose en los genes compartidos (genoma *core*).

4.3.3.4 Análisis de alelos MLST

El análisis de los alelos MLST para los diferentes esquemas empleados en la tipificación de *Leptospira* spp., permitió determinar cómo se agrupan los aislamientos locales respecto a otras cepas reportadas en la base de datos Pub-MLST, y respecto a ellos mismos. En la **Tabla 26**, se resumen los resultados obtenidos para cada esquema MLST.

Tabla 26. Secuenciotipos MLST obtenidos para los aislamientos de cada especie. Mientras que los aislamientos de *L. interrogans* mostraron un mismo ST en cada esquema, las cepas de *L. borgpetersenii* solo exhibieron el mismo perfil de alelos en el esquema 1. Los aislamientos de *L. noguchii* presentaron ST variable en cada esquema, no pudiéndose definir un secuenciotipo en base a lo ya reportado.

	<i>Esquema MLST</i>	<i>Secuenciotipo</i>
<i>L. interrogans</i>		140
	#1	
<i>L. borgpetersenii</i>	(<i>caiB, glmU, mreA, pfkB, pntA, sucA, tpiA</i>)	152
<i>L. noguchii</i>		ND
<i>L. interrogans</i>		52
	#2	
<i>L. borgpetersenii</i>	(<i>adk, glmU, icdA, lipL32, lipL41, mreA, pntA</i>)	ND
<i>L. noguchii</i>		ND
<i>L. interrogans</i>		58
	#3	
<i>L. borgpetersenii</i>	(<i>adk, icdA, lipL32, lipL41, rrs2, secY</i>)	ND
<i>L. noguchii</i>		ND

ND = No determinado.

De acuerdo al esquema 1, las cepas pertenecientes al serovar Kennewicki presentaron el mismo secuenciotipo, así como también fueron invariables aquellas provenientes del serovar Hardjo. Nuevamente, las cepas de *L. noguchii* exhibieron en cambio una gran heterogeneidad entre ellas, así como respecto a otros aislamientos, no pudiéndose asignar un número conocido de secuenciotipo (**Figura 30**).

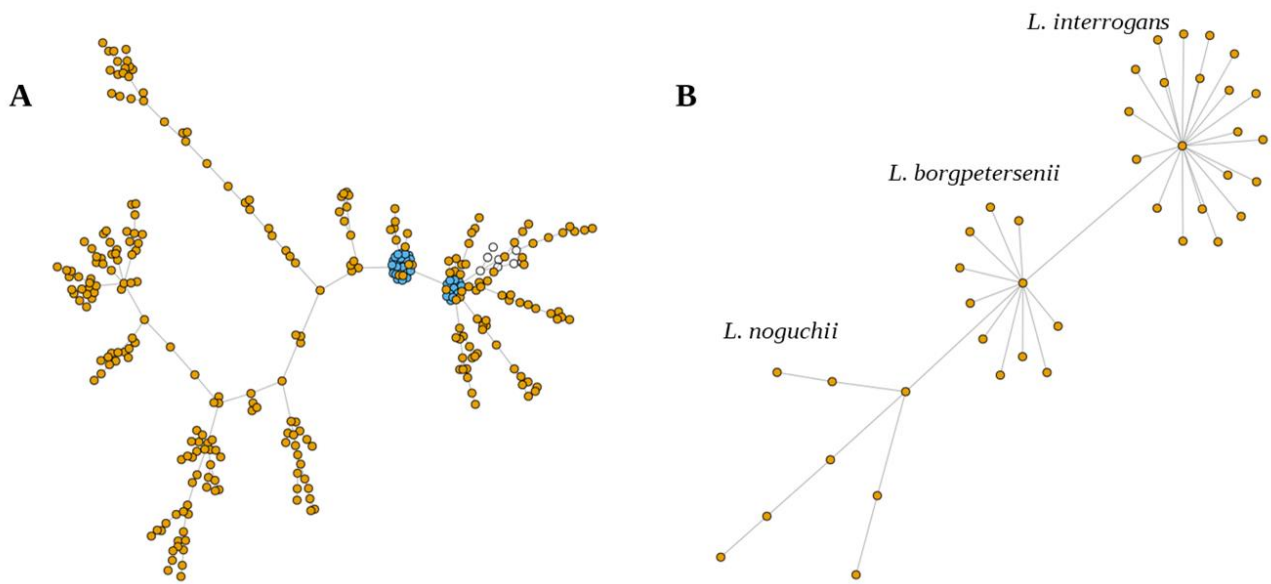


Figura 30. Análisis de genes MLST pertenecientes al esquema 1. En A se muestra la distribución respecto a cepas reportadas en Pub-MLST. En amarillo se representan los aislamientos de secuenciotipo (ST) conocido, presentes en dicha base de datos; en azul los aislamientos autóctonos a los que se les pudo asignar el ST; y en blanco aquellos aislamientos autóctonos a los que no. En B, se representan únicamente las cepas autóctonas donde claramente se evidencia la mayor diversidad en la especie *L. noguchii*.

Teniendo en cuenta los esquemas 2 y 3, tanto los aislamientos de *L. borgpetersenii* (sobre todo con el esquema 2) como los de *L. noguchii* presentaron variabilidad, sin asignación del secuenciotipo. *L. interrogans*, al igual que para el esquema 1, presentó un mismo ST para todas las cepas secuenciadas (**Figura 31**).

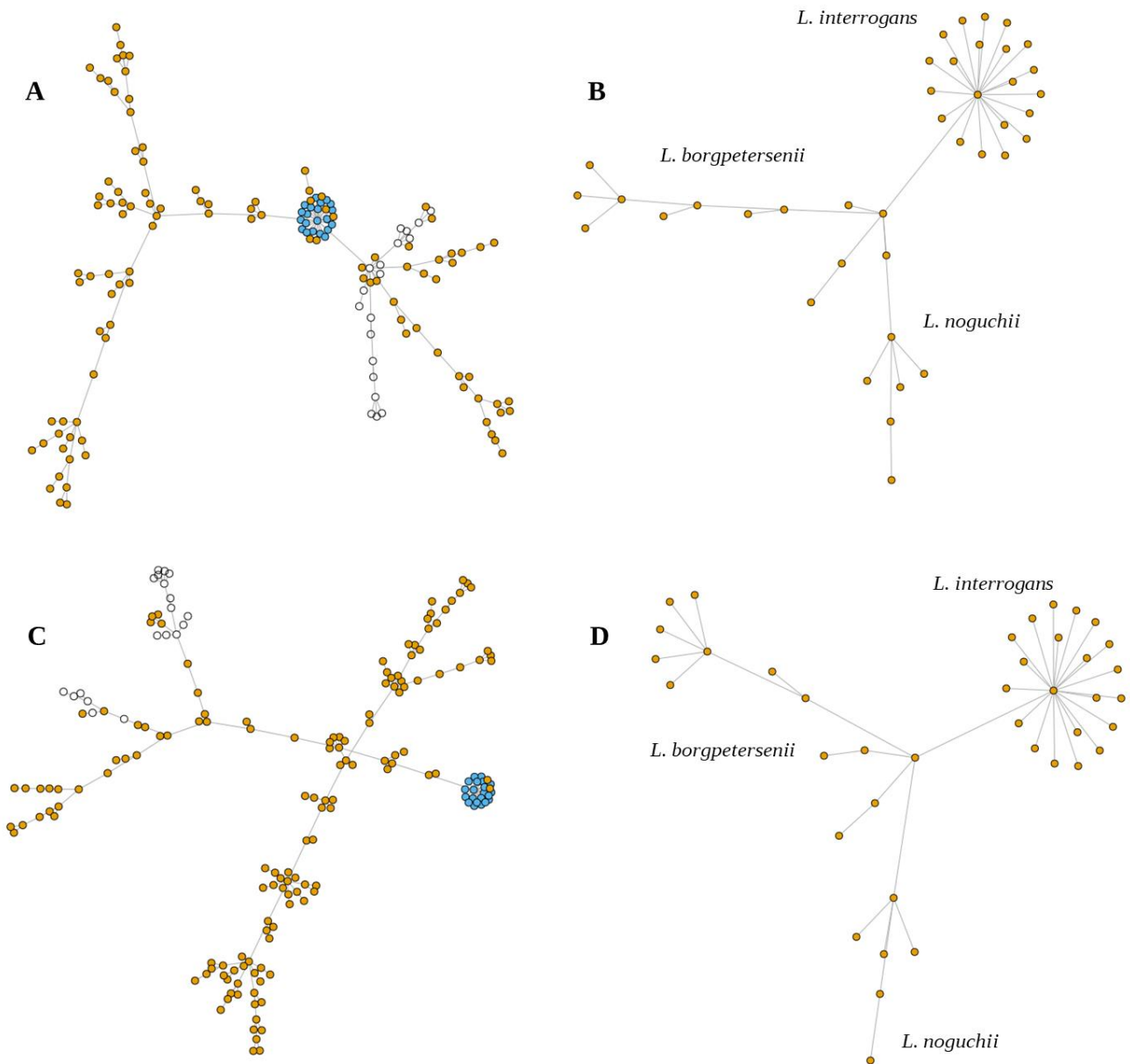


Figura 31. Análisis de genes MLST pertenecientes al esquema 2 y 3. En A y C se muestra la distribución respecto a cepas reportadas en Pub-MLST para los esquemas 2 y 3, respectivamente; en amarillo se representan los aislamientos de secuenciotipo (ST) conocido, presentes en dicha base de datos; en azul los aislamientos autóctonos a los que se les pudo asignar el ST; y en blanco aquellos aislamientos autóctonos a los que no se les pudo determinar este valor. En B y D, se representan únicamente las cepas autóctonas, para los esquemas 2 y 3, respectivamente, donde queda en evidencia la variabilidad tanto en los aislamientos de *L. borgpetersenii* como en *L. noguchii*.

5. DISCUSIÓN

La utilización de la biología molecular como herramienta para la detección y tipificación de microorganismos de interés sanitario, ha ido complementando las técnicas tradicionales utilizadas en laboratorios de diagnóstico, con la finalidad de agilizar la identificación del agente infeccioso y obtener resultados reproducibles. La caracterización de patógenos es fundamental en estudios epidemiológicos, ya que permite conocer la diversidad de las cepas circulantes en la región de estudio y aplicar este conocimiento en el diseño de estrategias eficaces de control y prevención de enfermedades.

La leptospirosis es mayoritariamente diagnosticada por evidencias clínicas y usando métodos serológicos para la confirmación. La técnica serológica de referencia es el test de microaglutinación, MAT (Musso & Lascola, 2013; OIE, 2004; Picardeau, 2013). Como se mencionó previamente, este método presenta inconvenientes en cuanto a sensibilidad y especificidad. Tampoco es útil para asignar variantes serológicas finas, de importancia en la elaboración de bacterinas así como en la predicción de virulencia para distintos hospederos. Para dicha determinación de serovar, también se emplea como método de referencia una técnica serológica, el test de aglutinación-absorción cruzada, CAAT. EL CAAT tiene sin embargo un elevado costo, es laborioso y requiere mucho tiempo hasta obtener resultados fidedignos, por lo que muy pocos laboratorios en el mundo lo realizan. Es en este escenario, en el que se planteó el objetivo de aplicar y desarrollar estrategias de biología molecular para facilitar las tareas de diagnóstico y de tipificación epidemiológica de la leptospirosis, fortaleciendo las capacidades nacionales de vigilancia y respuesta ante la enfermedad, además de aportar al conocimiento biológico profundo de la bacteria *Leptospira*.

Planteada dicha problemática, esta Tesis se desarrolló en el marco de un proyecto multidisciplinario e interinstitucional, en colaboración estrecha con laboratorios del MGAP, la UdelaR y el INIA. El objetivo central de dicho proyecto ha sido la obtención y colección de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. a partir de ganado bovino infectado en Uruguay, y la caracterización completa de las variantes circulantes. Para ello era imprescindible desarrollar y aplicar métodos moleculares para complementar las herramientas de diagnóstico y tipificación de *Leptospira* presentes en el país. Esta Tesis ha procurado contribuir precisamente en esta última dirección. En primer lugar planteándose el desafío de poder detectar el agente a partir de muestras biológicas, y luego tipificar las cepas autóctonas aisladas. Pero también, y como aspecto original para el conocimiento biológico de este grupo de bacterias Espiroquetas, se propuso explorar la hipótesis de una conexión entre el serovar (fenotipo) con el acervo de genes presentes en el genoma bacteriano. De lograr demostrar dicha hipótesis, y entender sus bases moleculares, se avistarían

métodos bien diferentes para tipificar este complejo taxón, y hacer abordajes epidemiológicos mucho más robustos. Poder avanzar más allá de los métodos serológicos, laboriosos y poco cuantitativos, será una contribución útil para la comunidad.

Nuevos métodos moleculares aplicados o desarrollados: su impacto en diagnóstico y tipificación

La aplicación de una PCR dirigida a la amplificación parcial del gen *lipL32*, sólo presente en especies patógenas de *Leptospira*, permitió agilizar la detección directa del agente presente en muestras de orinas. Este avance en Uruguay ha sido de suma utilidad para los laboratorios dedicados al aislamiento de la bacteria, por ejemplo y en especial para la División de Laboratorios Veterinarios del MGAP. Conociendo rápidamente qué muestras eran positivas por PCR, dichos laboratorios pudieron empezar a priorizar la observación al microscopio de los respectivos cultivos, teniendo en cuenta que cada muestra colectada representa tres tubos de cultivo en crecimiento, y que este género bacteriano es de crecimiento muy lento, con lo que el número de cultivos en seguimiento aumenta típicamente de manera exponencial. De allí la utilidad de evidenciar rápidamente la presencia de *Leptospira*, para el seguimiento prioritario de esos cultivos. No está demás señalar que ello no implica una sustitución, pues el cultivo microbiológico es una técnica más sensible, con lo que inóculos que estén por debajo de la sensibilidad analítica de la PCR no deben descartarse, y podrán eventualmente resultar en aislados valiosos.

El mismo protocolo de PCR también se adaptó a muestras de diversos tejidos provenientes de casos de aborto en bovinos, tales como hígado, riñón y líquido abomasal, en los cuáles se detectó la presencia de ADN de leptospiras patógenas en un 5% de las muestras analizadas. Este bajo porcentaje en la detección del agente contrasta con reportes previos en Uruguay (Easton, 2006), aunque dicho reporte se basaba en aproximaciones diferentes (histopatología en fetos y serología positiva en madres). No podemos descartar que en la actualidad la infección por *Leptospira* haya disminuido como factor causal de abortos en bovinos, aunque dicho escenario no parece compatible con serologías endémicas con valores históricos constantes y elevados (25-30% a nivel individual, y 70% a nivel de rodeos (Easton, 2006; Repiso M. V et al., 2005). Una alternativa que no se debe descartar es el estado en el que llegan los fetos a los laboratorios de diagnóstico: en la mayoría de los casos no son encontrados inmediatamente a que se produzca el aborto, sumado a la logística del transporte, en general se evidencia descomposición avanzada en los tejidos (autólisis), lo que puede conducir fácilmente a la degradación del ADN, imposibilitando su detección por PCR. En fin, un tercer escenario que no se puede descartar es que los abortos no se deban a la infección de leptospiras en el embrión, sino a patologías placentarias causadas por la bacteria, o bien incluso a síndromes

inflamatorios generalizados en la madre infectada, disparadores del aborto.

La aplicación de variantes de PCR más sensibles es una opción cuando se desea aumentar la capacidad de detección del ADN blanco. En este sentido, cada vez son más los protocolos de PCR en tiempo real aplicados a la detección de *Leptospira* spp., ya sea mediante el uso de sondas específicas o de agentes que se unen inespecíficamente a ADN doble hebra, pero son muy pocos los que han sido validados con muestras biológicas (Ahmed et al., 2012; Ahmed et al., 2009b; Bourhy et al., 2011a; Pakoa et al., 2018; Slack et al., 2007; Villumsen et al., 2012). Es por ello que se procuró diseñar un protocolo de qPCR de cuantificación absoluta, y validarlo para su uso en diversas muestras biológicas reales, buscando aumentar la sensibilidad de detección, y abaratando los costos. Los oligonucleótidos diseñados mostraron amplificación parcial específica del gen *lipL32* en las especies patógenas, no amplificando en especies saprófitas ni en otros géneros bacterianos no relacionados a *Leptospira*. La sensibilidad analítica fue dos órdenes mayor en comparación a la PCR a tiempo final, consiguiendo un límite inferior de detección de 10 bacterias, que corresponden a aproximadamente 15 equivalentes genómicos. Si bien esta sensibilidad es un orden menor respecto a protocolos desarrollados en base a sondas TaqMan, capaces de detectar alrededor de 1 equivalente genómico/ μL (Slack et al., 2007; Villumsen et al., 2012), mostró una sensibilidad mayor respecto a qPCRs en las cuáles se empleó SYBR Green como sonda, con límites de detección de 10^2 - 10^3 bacterias/mL (Bourhy et al., 2011b).

Una dificultad encontrada fue respecto al control interno de amplificación, el cuál mostró dos picos en la curva de disociación a temperaturas de 80 y 83°C, siendo esta última la única esperada. El análisis detallado de la secuencia de dicho control evidenció que las últimas tres bases del oligonucleótido *forward* hibridan en otro lugar generando un producto secundario de menor tamaño cuya temperatura de *melting* efectivamente es de 80°C; esta podría ser la probable causa del resultado. Si bien este producto es minoritario (por observación directa de los productos de qPCR por electroforesis en geles de agarosa), el pico sigue siendo detectable en la curva de disociación, aún tras el agregado de aditivos y/o variación de condiciones que favorezcan su hibridación sólo en el sitio primario. Para probar esta hipótesis se sintetizó un oligonucleótido alternativo, evitando dos de las tres bases potencialmente implicadas en la hibridación secundaria. Lamentablemente esa alternativa no permitió deshacernos del doble pico, sin poder entender completamente la razón última del problema. En todo caso, la amplificación de dicho producto secundario en el control interno, no interfiere en la detección del amplicón específico, cuya temperatura de *melting* se ubica bien diferenciada a 76°C. Si bien sería más elegante obtener un único producto de amplificación

tanto para el ADN blanco como para el IAC, ya han sido reportados otros casos con perfiles múltiples, siendo utilizados incluso en la diferenciación de especies (Behets et al., 2011).

Continuando con la validación de esta qPCR, se utilizaron muestras de riñón de jabalíes salvajes, y se detectó efectivamente ADN de leptospirosas patógenas en el 16% de las muestras analizadas, siendo este porcentaje similar al observado previamente en muestras de orina de bovinos. Si bien está reportado que el jabalí puede actuar como reservorio (Adler, 2015), y se han descrito casos donde este hospedero interviene en el ciclo de transmisión de la enfermedad (Jansen et al., 2006; Vale-Gonçalves et al., 2015), es importante remarcar el impacto que tiene este resultado, ya que desde 1982 el jabalí fue declarado plaga nacional debido a su gran incremento demográfico, sus hábitos predadores y omnivorismo (Lombardi, Geymonat, & Berrini, 2015). Más allá de haberse permitido la caza de este animal, su población sigue siendo importante y distribuida a nivel nacional. Los resultados aquí obtenidos indican que es un factor de riesgo en la transmisión de la leptospirosis, potencialmente a humanos que entren en contacto directo con los animales portadores, o bien que frecuenten las mismas zonas en las que ellos viven. En cuanto a la confirmación del rol del jabalí como reservorio importante en la transmisión de la leptospirosis, sería óptimo aislar las cepas de *Leptospira* spp. a partir de muestras de jabalí, y compararlas con las obtenidas a partir de bovinos (Zarantonelli et al., 2018), e incluso de humanos (Meny et al., 2017) en Uruguay. Si bien hay varios reportes donde se evidencia *Leptospira* spp. en jabalíes por métodos serológicos o moleculares (Koizumi et al., 2009; Vale-Gonçalves et al., 2015; Żmudzki et al., 2016), no existen prácticamente reportes de aislamientos, a excepción del recientemente obtenido en Argentina, donde se aisló la especie *L. borgpetersenii* (Brihuega et al., 2017).

En cuanto al impacto de los métodos moleculares en la tipificación de cepas aisladas de *Leptospira*, este trabajo se enfocó en uno de los objetivos centrales del proyecto multicéntrico: la leptospirosis bovina. De los 47 aislamientos obtenidos durante el lapso de esta Tesis, la aplicación complementaria de métodos serológicos tradicionales (para serogrupo) con métodos moleculares (secuenciación de *rrs* y análisis de perfiles VNTR) permitió tipificar hasta el nivel de serovar a todos los aislamientos de las especies *L. interrogans* (27 cepas diferentes) y *L. borgpetersenii* (11 aislados). En cepas de la especie *L. interrogans* se identificaron dos serovares: Kennewicki mayoritariamente (26/27), y Canicola en un aislamiento proveniente de un ternero con síntomas compatibles a leptospirosis aguda. Si se compara con países vecinos, tanto en Brasil como en Argentina la serovariedad perteneciente al serogrupo Pomona más comúnmente encontrada en bovinos es Pomona, no Kennewicki (Draghi et al., 2011; Moreno et al., 2018; Pavan et al., 2008),

siendo este último más frecuentemente asociado a abortos en equinos (Sheoran et al., 2000; Timoney et al., 2011). En la década de los 70, el serovar Kennewicki había sido eliminado de la lista de serovares por ser indiferenciable mediante métodos serológicos del serovar Pomona; años más tarde se demostró que por medio de análisis de endonucleasas de restricción, REA, sí era posible diferenciar ambos serovares, sugiriendo reincorporarla a la lista de serovares del serogrupo Pomona. Mediante genotipificación de los aislamientos uruguayos utilizando el alelo *secY*, se pudo determinar que no existen diferencias entre los serovares Pomona y Kennewicki (**Figura 25**), pero sí son claramente distinguibles a través del perfil VNTR: Kennewicki presenta un perfil 5-0-10, para los alelos VNTR-4, VNTR-7 y VNTR-10, respectivamente, mientras que Pomona exhibe el perfil 2-0-14 (Salaün et al., 2006). Por otra parte, el serovar Canicola, que ha sido previamente reportado en bovinos en nuestra región (Miraglia et al., 2012), presentó el mismo alelo *secY* que los serovares Kennewicki y Pomona (**Figura 25**), pero el perfil obtenido de la amplificación de alelos VNTR fue característico de la serovariedad asignada (Salaün et al., 2006).

Entre los aislamientos autóctonos identificados se encuentran por otro lado los pertenecientes a la especie *L. borgpetersenii*, todos ellos (11) categorizados dentro del serovar Hardjo, que es el serovar típicamente asociado o aclimatado a bovinos (Adler, 2015). Pese a esta fuerte asociación, su tasa de aislamiento es baja, probablemente debido a los requerimientos nutricionales que presenta, y a su muy lento crecimiento (Romalde et al., 2017), siendo únicamente reportados dos aislamientos en la región (Chideroli et al., 2016). Los aislamientos autóctonos que hemos tipificado presentaron el mismo alelo *secY* entre sí (**Figura 25**), y también con respecto a otros aislamientos de la misma especie y serovar (Zarantonelli et al., 2018), la mayoría de los cuales fueron obtenidos de bovinos.

Por último, las 9 cepas de *L. noguchii* fueron caracterizadas a nivel de serogrupo, mediante MAT, y genéticamente empleando el alelo *secY*. La caracterización serológica reveló que 4 de los 9 aislamientos pertenecen al serogrupo Autumnalis, 1 a Pyrogenes y 1 a Australis, mientras que a los 3 restantes fue imposible asignarle un serogrupo pues no presentaron aglutinación detectable con ninguno de los 24 antisueros de referencia del panel utilizado (KIT). Aislamientos del serogrupo Autumnalis como Australis ya han sido reportados en la región, específicamente en Brasil (Silva et al., 2009), siendo obtenidos de un hombre que tuvo contacto con animales de granja, y de un perro, respectivamente. El serogrupo Pyrogenes también ha sido aislado en Brasil, pero en animales salvajes, como la comadreja (Santa Rosa et al., 1975), y en Argentina a partir de casos de humanos (Chiani et al., 2016). En cuanto a los 3 aislamientos sin serogrupo asignado, aparentan ser diferentes, ya que mediante análisis filogenético del alelo *secY*, no se agrupan (**Figura 25**). En este mismo análisis filogenético, los aislamientos *L. noguchii* serogrupos Autumnalis y Australis de Brasil, no

exhiben el mismo alelo *secY* que los aislamientos autóctonos de esos serogrupos (Zarantonelli et al., 2018), por lo que incluso podrían tratarse de serovares diferentes. Aún más, los aislamientos pertenecientes a igual serogrupo no se agrupan en el mismo subclado, por lo que las serovariedades circulantes a nivel nacional podrían ser todas distintas. Es importante volver a recalcar que la inferencia de serovar en la especie *L. noguchii* es difícil actualmente, dado que los aislamientos reportados en bases de datos no están identificados a ese nivel, siendo de hecho muy pocos los que tienen serogrupo asignado, por lo que no hay información suficiente como para correlacionar serovares con marcadores moleculares y lograr la identificación. Es necesario desarrollar nuevas aproximaciones, quizás utilizando alelos VNTR, o bien directamente aprovechando secuencias de genomas completos, para la tipificación ágil de especies de *Leptospira* menos estudiadas como *L. noguchii*, que demuestran sin embargo ser epidemiológicamente relevantes en nuestra región.

Estudios genómicos de Leptospira: una conexión directa serovar-genotipo?

Con el advenimiento de las plataformas de secuenciación masiva o de próxima generación, se ha logrado conocer el genoma de muchos microorganismos de interés, permitiendo comprender las bases moleculares de la patogenia, así como el entendimiento de una diversidad de mecanismos biológicos extremadamente relevantes (motilidad, quimiotaxis, regulación metabólica, señalización, resistencia a antimicrobianos, etc). El conocimiento de determinantes genéticos es también importante con fines aplicados inmediatos, pues frecuentemente permite desarrollar métodos moleculares diagnósticos y/o de tipificación, y además, evaluar variabilidad de cepas circulantes por genómica comparativa hacia una epidemiología potente.

Este trabajo de Tesis permitió secuenciar los genomas completos de 40 de los aislamientos autóctonos. Con ello se pudo confirmar mediante el índice ANI, que efectivamente y hasta el momento, las cepas obtenidas se separan claramente en 3 especies ya conocidas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*. El tamaño de los genomas obtenidos varió dentro de lo esperado, siendo de aproximadamente 4.6 Mb para *L. interrogans* y 3.7 Mb para *L. borgpetersenii*, como se ha reportado anteriormente (Bulach et al., 2006; Nascimento et al., 2004; Ren et al., 2003). *L. noguchii* reveló un promedio de 4.7 Mb, lo que también concuerda con el tamaño de los genomas que se encuentran en bases de datos para dicha especie. Nueve de los genomas (seis correspondientes a *L. interrogans* y tres a *L. noguchii*) presentan un genoma aparentemente reducido respecto al resto de la misma especie (**Tabla 24**), pero coincide en todos los casos con genomas que resultaron con una calidad no óptima en el ensamblaje, por lo que seguramente en este proceso se haya perdido información.

El análisis del pangenoma a nivel de género evidenció un total de aproximadamente 8000 genes (**Figura 26**), dentro de los cuales alrededor de un 15% es compartido por todas las cepas secuenciadas, valores que coinciden con reportes previos (Picardeau et al., 2008), donde la comparación entre *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* muestra un 13% de genes compartidos. Dentro de los genes comunes a los 40 aislamientos, se pueden distinguir aquellos codificantes para proteínas ribosomales, y funciones del metabolismo que resultan esenciales para el funcionamiento de la célula bacteriana. Si bien un gran porcentaje de los genes encontrados son codificantes para proteínas hipotéticas, se vuelve necesaria la realización de un trabajo ulterior de curado manual, pues se pudo observar que no siempre el algoritmo implementado por Prokka identifica correctamente ortólogos que, sin embargo, son identificados por métodos estándar de alineamiento.

El análisis del genoma central deja en evidencia una cierta variabilidad en aquellas cepas pertenecientes tanto a *L. borgpetersenii* como *L. interrogans* que fueron del mismo serovar, con lo que dicha variación no se refleja en un cambio de serovariedad. En *L. borgpetersenii*, esto también fue evidenciado por medio del análisis de los genes correspondientes a los esquemas 2 y 3 del MLST, donde se ve una distribución heterogénea de los aislamientos (**Figura 31**). Estudios previos han revelado esta variabilidad dentro de aislamientos obtenidos a partir de bovinos, tanto para *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, como para *L. interrogans* serovar Pomona, donde en esta última el análisis de 6 alelos VNTR permitió determinar la presencia de diferentes genotipos para el mismo serovar (Pavan et al., 2011). Dentro de la serovariedad Hardjo de *L. borgpetersenii* se han descrito dos subtipos clonales, A y B, correspondientes a los genomas de referencia L550 (subtipo A) y JB197 (subtipo B), sugiriendo la existencia de heterogeneidad clonal en aislamientos de serovar Hardjo obtenidos del mismo tipo de hospedero (Llanes et al., 2018). Si bien se observa una variabilidad baja, donde, las cepas adaptadas al laboratorio son las que varían más (**Figura 32**), se han encontrado varias diferencias, incluyendo aquellos genes asociados a sobrevivencia y virulencia, como lo son genes de regulación transcripcional presentes en sistemas de dos componentes, TCS.

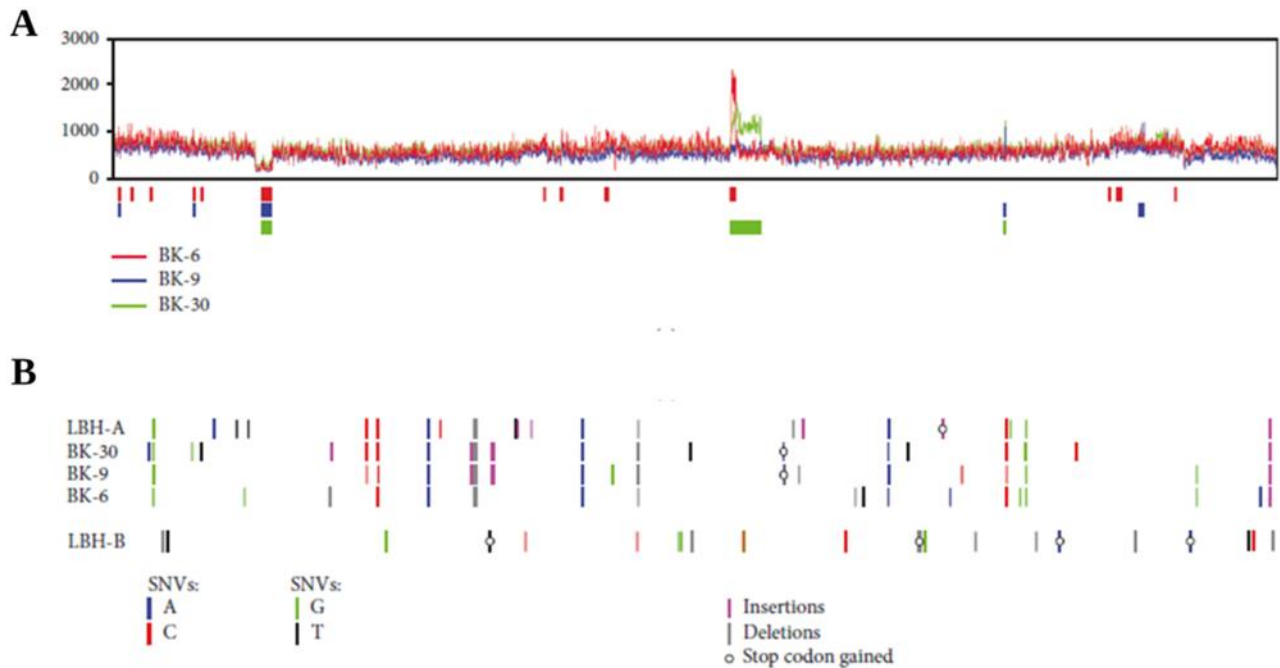


Figura 32. Variabilidad genética entre cepas pertenecientes a *L. borgpetersenii* serovar Hardjo. Variabilidad genética observada en tres cepas aisladas a partir de bovinos (Panel A). Variaciones puntuales de las tres cepas aisladas (BK-6, BK-9 y BK-30), con respecto a dos cepas aclimatadas a condiciones de laboratorio, LBH-A y LBH-B, pertenecientes a los subtipos A y B, respectivamente (Panel B). Adaptada de (Llanes et al., 2018).

La exploración de genomas accesorios que fueran compartidos por cada serogrupo y específicos para cada uno de ellos (**Figura 27**), evidenció en la mayoría de los casos un gran porcentaje de genes codificantes para proteínas hipotéticas, no obstante, será necesaria la realización de un curado manual, tal como se mencionó previamente. Dentro de los identificables es posible diferenciar genes codificantes para proteínas con funciones en el metabolismo, regulatorias, constituyentes de sistemas sensores y flagelares. En *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* se encontraron genes que codifican para proteínas de sistemas de exportación y ensamblaje del LPS, como LptC, o proteínas dedicadas específicamente al ensamblaje del mismo, como LapB, que modula los niveles de lipopolisacárido. *L. borgpetersenii* presenta, a su vez, muchas copias de bombas de eflujo catiónicas (CusA), que median resistencia a cobre y plata.

En las cepas del serogrupo Autumnalis se evidenció un gran número de transferasas, muchas de ellas probablemente participando en la síntesis de LPS, ya que son uno de los principales constituyentes en el locus *rfb*. Y así, en cada grupo destacan transposasas, metiltransferasas, e incluso enzimas que intervienen en la síntesis de KDO, uno de los monosacáridos más importantes del dominio central (*core*) del LPS.

Para explorar la conexión entre la variabilidad fenotípica de serovares y el acervo genético de las distintas cepas, se dirigió la búsqueda de genes constituyentes del locus *rfb*, en donde se sabe residen una cantidad de genes que codifican para proteínas importantes en la biosíntesis del antígeno O, principal responsable de la variabilidad a nivel de serovar (Adler, 2015). Sin embargo, no fue posible encontrar muchos de los genes pertenecientes al mismo, como por ejemplo algunos de los involucrados en la biosíntesis de dTDP-ramnosa (*rfbCDBA*). Antes de sacar conclusiones, parece fundamental complementar la aproximación seguida hasta ahora en la secuenciación de genomas, basada en la tecnología Illumina, con técnicas que permitan tener fragmentos secuenciados sensiblemente más largos, como PacBio o NanoPore. El uso “híbrido” de ambas aproximaciones, está permitiendo hoy en día la obtención de genomas cerrados en forma casi rutinaria (Rhoads & Au, 2015). Los genomas generados en el contexto de esta tesis son aún borrador, y presentan en este estado de avance una cantidad importante de *contigs*, que revelan fragmentación del genoma en la cual se puede estar perdiendo información importante en la determinación de serovar, por ejemplo. Estudios previos en los que se realizaron análisis bioinformáticos con un interés especial en biosíntesis del LPS, pudieron determinar que para la vía de biosíntesis de lípido A, el primer segmento del LPS anclado a la membrana, varios genes estaban ausentes en algunos de los genomas analizados, y especulan acerca de su posible pérdida durante la secuenciación sin contar con suficientes genomas cerrados para asegurar el análisis (Fouts et al., 2016). Dentro de los aislamientos obtenidos, ya se han seleccionado cepas representativas de todos los serovares diferentes o potencialmente diferentes identificados en este trabajo, y como parte de mi Doctorado en el Instituto Armand Frappier (laboratorio del Dr Frédéric Veyrier, Laval, Canadá), se continuará la colaboración recurriendo allí a una plataforma PacBio que está disponible. Resultan particularmente interesantes los aislamientos de *L. noguchii* que mostraron gran variabilidad tanto a nivel de serogrupo, *secY* e incluso mediante los tres esquemas de MLST, no pudiendo ser identificadas con ningún secuenciotipo reportado previamente en Pub-MLST, y siendo diferentes entre sí, reforzando la idea de que podrían tratarse, todos los aislados, de distintas serovariedades.

Como una de las perspectivas naturales y de enorme interés en la exploración del vínculo entre variabilidad serológica (antígenos inmunodominantes, proteicos y no proteicos) y genética, este trabajo deja abierta la necesidad de identificar antígenos a nivel de proteínas, expresadas en *Leptospira* spp. durante la infección. De hecho durante esta Tesis se comenzó a poner a punto métodos para purificar proteínas de membrana, así como para analizarlas mediante Western blot por inmunoreactividad contra sueros de animales infectados. La posibilidad de identificar antígenos comunes y diferenciales, apoyándose incluso en técnicas de inmunopurificación de antígenos y

análisis detallado por espectrometría de masa, tiene implicancias potencialmente importantes para el desarrollo de nuevas estrategias serodiagnósticas e inmunoprotectoras. Diversas aproximaciones en este sentido, yendo desde el uso de Western blots (Guerreiro et al., 2001), detección de múltiples antígenos mediante MAPIA (Thomé et al., 2014), desarrollo y análisis de microarreglos de proteínas (Lessa-Aquino et al., 2013), hasta el empleo efectivamente de espectrometría de masa (Kositanont et al., 2007) han permitido identificar proteínas reactivas tanto en sueros de humanos como de animales. Dentro de las proteínas identificadas se pueden encontrar DnaK, GroEL, OmpL1, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45/31, LigA, LigB, entre otras, la mayoría de ellas expuestas en la superficie bacteriana. Poder distinguir proteínas universalmente reconocidas por reacción con sueros positivos, así como aquellas específicas, ya sea de enfermedad aguda, o fase convalescente (Lessa-Aquino et al., 2013), o de serovares determinados, podría redundar en mejores métodos diagnóstico (Kositanont et al., 2007). Asimismo, poder eventualmente identificar antígenos que discriminen sueros de animales infectados de vacunados, sería una contribución bien importante en el área veterinaria. Resultará relevante incluir todas las serovariedades aisladas hasta el momento, y estudiar el perfil diferencial de reconocimiento. La disponibilidad de sueros de animales infectados, de animales sanos vacunados, así como sueros negativos, permitirá la purificación e inmovilización de anticuerpos en columnas de inmunoafinidad. Con los protocolos que ya se han comenzado a poner a punto en el laboratorio para generar preparaciones de proteínas de membrana y periplásmicas (adaptado de Brusca & Radolf, 1994), dichos extractos se podrán purificar en las columnas de inmunoafinidad, eluir selectivamente proteínas reactivas, e identificarlas por espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida (LC-MS). Esta es una línea clara de investigación inmediata de continuidad con este trabajo de Tesis, y de posible impacto en diagnóstico, en tipificación y en desarrollo de vacunas eficaces a subunidad.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió contribuir en el mejoramiento de las herramientas nacionales para la detección y tipificación de *Leptospira* spp., empleadas para el estudio de la leptospirosis bovina. Los protocolos desarrollados y validados pudieron ser exitosamente transferidos a la red de laboratorios de diagnóstico veterinario (DILAVE) del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca así como también a los laboratorios de diagnóstico de la Plataforma de Salud Animal de INIA. La aplicación de PCR dirigidas a la detección de especies patógenas en matrices biológicas permitió confirmar recientemente un brote de leptospirosis en ovinos, así como colaborar en el seguimiento de cultivos, aumentando la tasa de éxito en el aislamiento del agente.

La aplicación de métodos serológicos y moleculares permitió determinar la identidad de los aislamientos obtenidos, revelando por vez primera en forma directa, serovariedades circulantes a nivel nacional: 26 aislamientos correspondieron a *L. interrogans* Pomona Kennewicki, 11 a *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo, 4 a *L. noguchii* Autumnalis, 1 a *L. interrogans* Canicola Canicola, *L. noguchii* Australis y *L. noguchii* Pyrogenes, y 3 aislamientos de *L. noguchii* sin serogrupo identificado. Para ninguno de los aislados de *L. noguchii* fue posible determinar serovar.

La secuenciación de genomas completos permitió evaluar la variabilidad genética de las cepas circulantes, dejando en evidencia que aun aquellas cepas pertenecientes a una misma serovariedad presentan genotipos levemente diferentes. De cualquier modo vale la pena notar que la variabilidad genética de las diferentes cepas aisladas de *L. noguchii*, es significativamente mayor a la observada en *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. El análisis de genes específicos de serogrupo e incluso de variantes genéticas estudiando cepas individuales, reveló listas iniciales de candidatos interesantes, muchos asociados a modificación de azúcares. Es intrigante el porcentaje sustancial de genes que codifican proteínas hipotéticas en estos genomas accesorios, resaltando la importancia de profundizar la investigación experimental de la Biología de *Leptospira*.

Será necesaria la obtención de genomas cerrados, donde no se pierda información relevante, para catalizar la identificación de determinantes genéticos clave en la determinación de serovar. Dicha información será particularmente importante en *L. noguchii* donde la caracterización a nivel de serovar es hoy aún muy limitada, así como la información genómica en sí. Esta línea está muy activa, y será un nexo directo con estudios complementarios de caracterización de antígenos proteicos, para entender las bases moleculares de la diversidad serológica de *Leptospira*.

7. AGRADECIMIENTOS

A **Alejandro y Leticia**, mis tutores, por haberme permitido trabajar en este gran proyecto en el cual se estaban aventurando, y haber constituido un pilar importantísimo en mi formación como microbióloga, brindándome las herramientas y conocimientos para desenvolverme como tal.

A **Noé**, por ser mi cable a tierra, transmitiéndome paz en los momentos que la necesité, y siendo mi compañero de vida desde hace ya varios años, soportando mis defectos y mis virtudes.

A los **miembros del Tribunal**, por su generosidad y tiempo al haber aceptado evaluar este trabajo.

A **mi familia**, por siempre estar pese a cualquier situación adversa, y haberme inculcado un sinfín de valores que son la base de quién soy.

A mis compañeros del laboratorio: **Cami, Fabi, Nicky, Juan, Joaco y Feli**, por el apoyo diario, su compañerismo, y su aporte humano y científico.

Al **Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis**, donde cada integrante fue fundamental compartiendo su conocimiento y enriqueciendo el trabajo de todos.

A **Flor Díaz**, de la Unidad de Biología Molecular por su gran ayuda en los experimentos de secuenciado masivo realizados aquí, en el Instituto.

A **Nacho y Goyo**, de la Unidad de Bioinformática por su aporte invaluable y su paciencia al brindarme ayuda con el análisis de los genomas secuenciados.

A **mis amigos**, por tantos momentos compartidos durante todos estos años.

Y a **todos aquellos**, que de una u otra manera hicieron posible transitar este camino.

¡Gracias!

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, B. (2014). Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. *Veterinary Microbiology*, 172(3–4), 353–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.015>
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010a). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 287–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010b). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Adler, B. et al. (2015). *Leptospira and Leptospirosis*. (B. Adler, Ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8>
- Ahmed, A., Engelberts, M. F. M., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2009a). Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- Ahmed, A., Engelberts, M. F. M., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2009b). Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *PLoS ONE*, 4(9), e7093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- Ahmed, A., L. B. M. Klaasen, H., van der Veen, M., van der Linden, H., G. A. Goris, M., & A. Hartskeerl, R. (2012). Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of *Leptospira* in Canine Samples. *Advances in Microbiology*, 02(02), 162–170. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.22021>
- Ahmed, A., Thaipadungpanit, J., Boonsilp, S., Wuthiekanun, V., Nalam, K., Spratt, B. G., ... Peacock, S. J. (2011). Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11), e1374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001374>
- Ahmed, N., Devi, S. M., de los Á Valverde, M., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
- Arahal, D. R. (2014). Whole-Genome Analyses (pp. 103–122). <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.07.002>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L., & Ollevier, F. (2006). Quantitative Detection and Differentiation of Free-Living *Amoeba* Species Using SYBR Green–Based Real-Time PCR Melting Curve Analysis. *Current Microbiology*, 53(6), 506–509. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0241-0>
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., ... Vinetz, J. M. (2003). Figures from Leptospirosis - a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757–771.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M. S., Holden, M. T. G., ... Peacock, S. J. (2013). A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS*

Neglected Tropical Diseases, 7(1), e1954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>

- Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C., & Picardeau, M. (2011a). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2154–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.02452-10>
- Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C., & Picardeau, M. (2011b). Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 49(6), 2154–2160. <https://doi.org/10.1128/JCM.02452-10>
- Bourhy, P., Herrmann Storck, C., Theodose, R., Olive, C., Nicolas, M., Hochedez, P., ... Picardeau, M. (2013). Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2114. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114>
- Brihuega, B., Loffler, S. G., Samartino, L., Auteri, C., & Martinez, M. (2017). First Isolation of *Leptospira borgpetersenii* from Fetuses of Wild Boars (*Sus scrofa*), 13(1), 63–66.
- Brusca, J. S., & Radolf, J. D. (1994). [17] Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with triton X-114 (pp. 182–193). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)28019-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)28019-3)
- Bulach, D. M., Kalambaheti, T., De La Peña-Moctezuma, A., & Adler, B. (2000). Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Leptospira*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 2(4), 375–380. Retrieved from <https://www.caister.com/jmmb/v/v2/v2n4/06.pdf>
- Bulach, D. M., Zuerner, R. L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P. a, ... Adler, B. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14560–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103>
- Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol*. 1971;9:186-194
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Chang, M.-Y., Cheng, Y.-C., Hsu, S.-H., Ma, T.-L., Chou, L.-F., Hsu, H.-H., ... Yang, C.-W. (2016). Leptospiral outer membrane protein LipL32 induces inflammation and kidney injury in zebrafish larvae. <https://doi.org/10.1038/srep27838>
- Charan, J., Saxena, D., Mulla, S., & Yadav, P. (2013). Antibiotics for the treatment of leptospirosis: systematic review and meta-analysis of controlled trials. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(5), 501–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930159>
- Chiani, Y., Jacob, P., Varni, V., Landolt, N., Schmeling, M. F., Pujato, N., ... Vanasco, B. (2016). Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033>
- Chideroli, R. T., Pereira, U. P., Gonçalves, D. D., Nakamura, A. Y., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F., & Freitas, J. C. (2016). Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the

urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15(1).

<https://doi.org/10.4238/gmr.15018473>

Chou, L.-F., Chen, Y.-T., Lu, C.-W., Ko, Y.-C., Tang, C.-Y., Pan, M.-J., ... Yang, C.-W. (2012). Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene*, 511(2), 364–70.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.074>

Choy, H. A., & Stevenson, B. (2012). Multiple Activities of LigB Potentiate Virulence of *Leptospira interrogans*:

Inhibition of Alternative and Classical Pathways of Complement. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041566>

Cosate, M. R. V., Soares, S. C., Mendes, T. A., Raittz, R. T., Moreira, E. C., Leite, R., ... Ortega, J. M. (2015). Whole-Genome Sequence of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo Subtype Hardjoprajitno Strain Norma, Isolated from Cattle in a Leptospirosis Outbreak in Brazil. *Genome Announcements*, 3(6), e01302-15.

<https://doi.org/10.1128/genomeA.01302-15>

Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., ... Ko, A. I. (2015). Global

Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9),

e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A. I., Haake, D. A., & Adler, B. (2005). Surfaceome of *Leptospira*

spp. *INFECTION AND IMMUNITY*, 73(8), 4853–4863. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4853-4863.2005>

Dib, C. C., Gonçalves, A. P., Morais, Z. M. de, Souza, G. O. de, Miraglia, F., Abreu, P. A. E., & Vasconcellos, S. A.

(2014). Cross-protection between experimental anti-leptospirosis bacterins. *Brazilian Journal of Microbiology*,

45(3), 1083–1088. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300042>

Draghi, M. G., Brihuega, B., Benítez, D., Sala, J. M., Biotti, G. M., Pereyra, M., ... Guariniello, L. (2011). [Leptospirosis

outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina]. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 42–4.

<https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000100009>

Easton, M. (2006). *Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay*. Faculty of Veterinary, University of the Republic, Montevideo, Uruguay.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and*

Infection, 4(8), 837–851. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0)

Evangelista, K. V., Lourdault, K., Matsunaga, J., & Haake, D. A. (2017). Immunoprotective properties of recombinant

LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLOS ONE*, 12(7), e0180004.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180004>

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999. 272 p.

Ferrés, I., & Iraola, G. (2018a). MLSTar: automatic multilocus and core genome sequence typing in R.

<https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26630v2>

Ferrés, I., & Iraola, G. (2018b). Phylen: automatic phylogenetic reconstruction using the EggNOG database.

<https://doi.org/10.21105/joss.00593>

Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D. E., ... Vinetz, J. M. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLOS Neglected*

Tropical Diseases, 10(2), e0004403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

- GLENN, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- Goldstein, S. F., & Charon, N. W. (1988). Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 9(2), 101–10. <https://doi.org/10.1002/cm.970090202>
- Guégan, R., Camadro, J.-M., Saint Girons, I., & Picardeau, M. (2004). *Leptospira* spp. possess a complete haem biosynthetic pathway and are able to use exogenous haem sources. *Molecular Microbiology*, 49(3), 745–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03589.x>
- Guerreiro, H., Croda, J. L., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galv, M., ... Haake, D. A. (2001). Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. *INFECTION AND IMMUNITY*, 69(8), 4958–4968. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146(7), 1491–1504. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-7-1491>
- Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L., Barnett, J. K., Barnett, D., Mazel, M., ... Bolin, C. A. (2000). The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *INFECTION AND IMMUNITY*, 68(4), 2276–2285. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97414/pdf/ii002276.pdf>
- Haake, D. A., & Matsunaga, J. (2010). *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Molecular Microbiology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x>
- Haake, D. A., Suchard, M. A., Kelley, M. M., Dundoo, M., Alt, D. P., & Zuerner, R. L. (2004). Molecular Evolution and Mosaicism of Leptospiral Outer Membrane Proteins Involves Horizontal DNA Transfer. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 186(9), 2818–2828. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2818-2828.2004>
- Haake, D. A., & Zückert, W. R. (2015). The Leptospiral Outer Membrane (pp. 187–221). https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_8
- HAMOND, C., PESTANA, C. P., MEDEIROS, M. A., & LILENBAUM, W. (2016). Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiology and Infection*, 144(01), 72–75. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001363>
- Hollingshead, S. K., Becker, R., & Briles, D. E. (2000). Diversity of PspA: Mosaic Genes and Evidence for Past Recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *INFECTION AND IMMUNITY*, 68(10), 5889–5900. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101551/pdf/ii005889.pdf>
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). MINIREVIEW Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(5), 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004>
- Illumina. (2010). Technology Spotlight: Illumina® Sequencing. Retrieved from

https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

- Illumina. (2015). Guía del sistema MiSeq. Retrieved from https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/translations/miseq-system-guide-15027617-01-esp.pdf
- Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Ito, H., & Wani, H. (1916). THE SERUM TREATMENT OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTEROHAEMORRHAGICA). *The Journal of Experimental Medicine*, 24(5), 485–96. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2125472/pdf/485.pdf>
- Jansen, A., Nöckler, K., Schönberg, A., Luge, E., Ehlert, D., & Schneider, T. (2006). Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(8), 544–546. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0174-3>
- Jorge, S., Schmitt Kremer, F., Rodrigues De Oliveira, N., De, G., Sanches, O., Navarro, V., ... Dellagostin, O. A. (2018). Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 113(2), 80–86. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170130>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-I., & Miyata, T. (n.d.). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC135756/pdf/gkf436.pdf>
- Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(10), 736–47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- KOIZUMI, N., MUTO, M., YAMADA, A., & WATANABE, H. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. in the Kidneys of Wild Boars and Deer in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 797–799. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.797>
- Koizumi, N., & Watanabe, H. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiology Letters*, 226(2), 215–219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00619-0)
- Kositanont, U., Saetun, P., Krittanai, C., Dounghawee, G., Tribuddharat, C., & Thongboonkerd, V. (2007). Application of immunoproteomics to leptospirosis: towards clinical diagnostics and vaccine discovery. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 1(4), 400–409. <https://doi.org/10.1002/prca.200600805>
- Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V., & Prapasarakul, N. (2017). Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Research in Veterinary Science*, 115, 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2017.03.017>
- Lessa-Aquino, C., Borges Rodrigues, C., Pablo, J., Sasaki, R., Jasinskas, A., Liang, L., ... Felgner, P. L. (2013). Identification of Seroreactive Proteins of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni Using a High-Density Protein Microarray Approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2499. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002499>
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology*, 14(2), 296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296>
- Liò, P., & Goldman, N. (1998). Models of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Research*, 8(12), 1233–1244. <https://doi.org/10.1101/gr.8.12.1233>

- Llanes, A., Restrepo, C. M., Riesgo-Ferreiro, P., & Rajeev, S. (2018). Genomic Variability among Field Isolates and Laboratory-Adapted Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. *International Journal of Microbiology*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/2137036>
- Lo, Y.-Y., Hsu, S.-H., Ko, Y.-C., Hung, C.-C., Chang, M.-Y., Hsu, H.-H., ... Pan, R.-L. (2013). Essential Calcium-binding Cluster of *Leptospira* LipL32 Protein for Inflammatory Responses through the Toll-like Receptor 2 Pathway * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418699>
- Lombardi, R., Geymonat, G., & Berrini, R. (2015). *El jabalí en el Uruguay. Problema, desafío y oportunidad*.
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- Malmström, J., Beck, M., Schmidt, A., Lange, V., Deutsch, E. W., & Aebbersold, R. (2009). Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*, 460(7256), 762–765. <https://doi.org/10.1038/nature08184>
- Martínez, R., Pérez, A., del Quiñones, M. C., Cruz, R., Álvarez, Á., Armesto, M., ... Clara, S. (2004). Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba Artículo original / Original research. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 15(4), 249–55. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/8282/20909.pdf?sequence=1>
- Matsunaga, J., Barocchi, M. A., Croda, J., Young, T. A., Sanchez, Y., Siqueira, I., ... Ko, A. I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, 49(4), 929–945. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1237129/pdf/nihms2236.pdf>
- Matsunaga, J., Sanchez, Y., Xu, X., & Haake, D. A. (2005). Osmolarity, a Key Environmental Signal Controlling Expression of *Leptospiral* Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA. *INFECTIO AND IMMUNITY*, 73(1), 70–78. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.70-78.2005>
- Mcbride, A. J. A., Cerqueira, G. M., Suchard, M. A., Moreira, A. N., Zuerner, R. L., Reis, M. G., ... Dellagostin, O. A. (2009). Genetic diversity of the *Leptospiral* immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. NIH Public Access. *Infect Genet Evol*, 9(2). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.10.012>
- Meny, P., Menéndez, C., Quintero, J., Hernández, E., Ríos, C., Balassiano, I. T., ... Varela, G. (2017). Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759079>
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2219–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400983>
- Miraglia, F., de Moraes, Z. M., Dellagostin, O. A., Seixas, F. K., Freitas, J. C., Zacarias, F. G. S., ... Moreno, A. M. (2012). Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), 117–121. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0181-6>
- Mitchison, M., Bulach, D. M., Vinh, T., Rajakumar, K., Faine, S., & Adler, B. (1997). Identification and Characterization

of the dTDP-Rhamnose Biosynthesis and Transfer Genes of the Lipopolysaccharide-Related rfb Locus in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 179(4), 1262–1267. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178824/pdf/1791262.pdf>

- Moreno, L. Z., Kremer, F. S., Miraglia, F., Loureiro, A. P., Eslabao, M. R., Dellagostin, O. A., ... Moreno, A. M. (2016). Comparative genomic analysis of Brazilian *Leptospira kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 111(8), 539–541. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160174>
- Moreno, L. Z., Miraglia, F., de Oliveira, C. H., Vasconcellos, S. A., Heinemann, M. B., & Moreno, A. M. (2018). Draft Genome Sequence of Brazilian *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Strain GR5, Isolated from Apparently Healthy Gilt. *Genome Announcements*, 6(23). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00491-18>
- Murray, G. L. (2015). The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 387, pp. 139–185). https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_7
- Murray, G. L., Srikram, A., Henry, R., Hartskeerl, R. A., Sermswan, R. W., & Adler, B. (2010). Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Molecular Microbiology*, 78(3), 701–709. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07360.x>
- Murray, G. L., Srikram, A., Henry, R., Puapairoj, A., Sermswan, R. W., & Adler, B. (2009). *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes and Infection*, 11(2), 311–4. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.11.014>
- Murray, G. L., Srikram, A., Hoke, D. E., Wunder, E. A., Henry, R., Lo, M., ... Adler, B. (2009). Major Surface Protein LipL32 Is Not Required for Either Acute or Chronic Infection with *Leptospira interrogans*. *INFECTIO AND IMMUNITY*, 77(3), 952–958. <https://doi.org/10.1128/IAI.01370-08>
- Musso, D., & Lascola, B. (2013). Diagnostic biologique de la leptospirose. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2013(449), 39–46. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)71826-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)71826-4)
- Mustapha, M. M., Marsh, J. W., Krauland, M. G., Fernandez, J. O., de Lemos, A. P. S., Hotopp, J. C. D., ... Harrison, L. H. (2016). Genomic Investigation Reveals Highly Conserved, Mosaic, Recombination Events Associated with Capsular Switching among Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W Sequence Type (ST)-11 Strains. *Genome Biology and Evolution*, 8(6), 2065–2075. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw122>
- Nally, E., Whitelegge, J. P., Bassilian, S., Blanco, D. R., & Lovett, M. A. (2007). Characterization of the Outer Membrane Proteome of *Leptospira interrogans* Expressed during Acute Lethal Infection. *INFECTIO AND IMMUNITY*, 75(2), 766–773. <https://doi.org/10.1128/IAI.00741-06>
- Nally, J. E., Bayles, D. O., Hurley, D., Fanning, S., McMahon, B. J., & Arent, Z. (2016). Complete Genome Sequence of *Leptospira alstonii* Serovar Room22 Strain GWTS #1. *Genome Announcements*, 4(6), e01230-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01230-16>
- Nally, J. E., Chow, E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R., & Lovett, M. A. (2005). Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. *INFECTIO AND IMMUNITY*, 73(6), 3251–3260. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3251-3260.2005>
- Nascimento, A. L. T. O., Ko, A. I., Martins, E. A. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Ho, P. L., Haake, D. A., ... Giglioti, E. A. (2004). Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology

and Pathogenesis. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 186(7), 2164–2172. [https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164–2172.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004)

- OIE. (2004). Leptospirosis. *Manual de La OIE Sobre Animales Terrestres, I*(Capítulo 2.2.4), 343–355. Retrieved from <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., ... Parkhill, J. (n.d.). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Page, A. J., De Silva, N., Hunt, M., Quail, M. A., Parkhill, J., Harris, S. R., ... Keane, J. A. (n.d.). Robust high-throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000083>
- Pakoa, J. G., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Takau, D., Gaviga, J., Gourinat, A.-C., ... Goarant, C. (2018). High incidence of leptospirosis in an observational study of hospital outpatients in Vanuatu highlights the need for improved awareness and diagnostic capacities. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), e0006564. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006564>
- Palaniappan, R. U. M., Chang, Y.-F., Chang, C.-F., Pan, M. J., Yang, C. W., Harpending, P., ... Roe, B. (2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and Cellular Probes*, 19(2), 111–7. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.002>
- Patra, K. P., Choudhury, B., Matthias, M. M., Baga, S., Bandyopadhyay, K., & Vinetz, J. M. (2015). Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7>
- Pavan, M. E., Cairó, F., Brihuega, B., & Samartino, L. (2008). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.03.004>
- Pavan, M. E., Cairó, F., Pettinari, M. J., Samartino, L., & Brihuega, B. (2011). Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(2), 135–41. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.002>
- Perez, J., & Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*, 10(1), 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297–307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., ... Adler, B. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PloS One*, 3(2), e1607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>
- Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., ... Adler, B. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>

- Picardeau, M., Lilenbaum, W., Bourhy, P., Pinna, M., Medeiros, M. A., & Hamond, C. (2015). A multilocus variable number tandem repeat analysis assay provides high discrimination for genotyping *Leptospira santarosai* strains. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(5), 507–512. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000045>
- Pinne, M., & Haake, D. A. (2009). A Comprehensive Approach to Identification of Surface- Exposed, Outer Membrane- Spanning Proteins of *Leptospira interrogans*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006071>
- Pinne, M., & Haake, D. A. (2013). LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051025>
- Puche, R., Ferrés, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., & Iraola, G. (2018). *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(2), 513–517. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>
- Que-Gewirth, N. L. S., Ribeiro, A. A., Kalb, S. R., Cotter, R. J., Bulach, D. M., || B. A., ... Raetz, C. R. H. (2004). A Methylated Phosphate Group and Four Amide-linked Acyl Chains in *Leptospira interrogans* Lipid A. The Membrane Anchor of an Unusual Lipopolysaccharide that Activates TLR2. *J Biol Chem*, *279*(24), 25420–25429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400598200>
- Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., ... Zhao, G.-P. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, *422*(6934), 888–893. <https://doi.org/10.1038/nature01597>
- Ren, S., Fu, G., Jiang, X., & Zeng, R. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing, *422*(April). <https://doi.org/10.1038/nature01542.1>.
- Repiso M. V, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, ... Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria*, *40*157, 5–28. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/145-prevalencia_uruguay.pdf
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Ricaldi, J. N., Fouts, D. E., Selengut, J. D., Harkins, D. M., Patra, K. P., Moreno, A., ... Matthias, M. A. (2012). Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>
- Riediger, I. N., Stoddard, R. A., Ribeiro, G. S., Nakatani, S. M., Moreira, S. D. R., Skraba, I., ... Wunder, E. A. (2017). Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira lipL32*-based real-time PCR assay. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(9), e0005940. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005940>
- Ristow, P., Bourhy, P., McBride, F. W. da C., Figueira, C. P., Huerre, M., Ave, P., ... Picardeau, M. (2007). The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *PLoS Pathogens*, *3*(7), e97. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030097>
- Romalde, J. L., Kumar, S., Chideroli, R. T., Gonçalves, D. D., Suphoronski, S. A., Alfieri, A. F., ... Pereira, P. (2017). Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>
- Salaün, L., Mérien, F., Gurianova, S., Baranton, G., & Picardeau, M. (2006). Application of multilocus variable-number

- tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3954–62. <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06>
- Sampson, T. R., Saroj, S. D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y.-L., & Weiss, D. S. (2013). A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 497(7448), 254–257. <https://doi.org/10.1038/nature12048>
- Santa Rosa, C. A., Sulzer, C. R., Giorgi, W., da Silva, A. S., Yanaguita, R. M., & Lobao, A. O. (1975). Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the pyrogenes group. *American Journal of Veterinary Research*, 36(9), 1363–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1163877>
- Santos-Júnior, C. D., Veríssimo, A., & Costa, J. (2016). The recombination dynamics of *Staphylococcus aureus* inferred from spA gene. *BMC Microbiology*, 16(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0757-9>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sheoran, A. S., Nally, J. E., Donahue, J. M., Smith, B. J., & Timoney, J. F. (2000). Antibody isotypes in sera of equine fetuses aborted due to *Leptospira interrogans* serovar pomona-type kennewicki infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77(3–4), 301–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137127>
- Silva, É. F., Cerqueira, G. M., Seyffert, N., Seixas, F. K., Hartwig, D. D., Athanazio, D. A., ... Medical, W. (2009). *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 621–622. <https://doi.org/10.3201/eid1504.071669>
- Slack, A., Symonds, M., Dohnt, M., Harris, C., Brookes, D., & Smythe, L. (2007). Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4), 361–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.004>
- Slamti, L., De Pedro, M. A., Guichet, E., & Picardeau, M. (2011). Deciphering Morphological Determinants of the Helix-Shaped *Leptospira*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 193(22), 6266–6275. <https://doi.org/10.1128/JB.05695-11>
- Suepaul, S. M., Carrington, C. V., Campbell, M., Borde, G., & Adesiyun, A. A. (2010). Study on the efficacy of *Leptospira* vaccines developed from serovars isolated from Trinidad and comparison with commercial vaccines using a hamster model. *Vaccine*, 28(33), 5421–5426. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.019>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Tahara, H., Takabe, K., Sasaki, Y., Kasuga, K., Kawamoto, A., Koizumi, N., & Nakamura, S. (2018). The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: Swimming and crawling. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5976277/pdf/aar7975.pdf>
- Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., & Kudo, S. (2013). Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology and Immunology*, 57(3), 236–9. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12018>
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., ... Goarant, C. (2018).

Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9(May), 816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>

- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., ... Goarant, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, 4(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Thomé, S., Lessa-Aquino, C., Ko, A. I., Lilenbaum, W., & Medeiros, M. A. (2014). Identification of immunodominant antigens in canine leptospirosis by Multi-Antigen Print ImmunoAssay (MAPIA). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0288-2>
- Timoney, J. F., Kalimuthusamy, N., Velineni, S., Donahue, J. M., Artiushin, S. C., & Fetting, M. (2011). A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Veterinary Microbiology*, 150(3–4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.049>
- Vale-Gonçalves, H. M., Cabral, J. A., Faria, M. C., Nunes-Pereira, M., Faria, A. S., Veloso, O., ... Paiva-Cardoso, M. N. (2015). Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: Risk factor analysis. *Epidemiology and Infection*, 143(10), 2126–2130. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003331>
- Varni, V., Ruybal, P., Lauthier, J. J., Tomasini, N., Brihuega, B., Koval, A., & Caimi, K. (2014). Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 22, 216–22. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.002>
- Villanueva, M. A., Mingala, C. N., Balbin, M. M., Nakajima, C., Isoda, N., Suzuki, Y., & Koizumi, N. (2016). Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. among large ruminants in the Philippines. *J. Vet. Med. Sci*, 78(11), 1649–1655. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0289>
- Villumsen, S., Pedersen, R., Borre, M. B., Ahrens, P., Jensen, J. S., & Krogfelt, K. A. (2012). Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 184–90. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.009>
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T.-H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., ... Ulevitch, R. J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology*, 2(4), 346–352. <https://doi.org/10.1038/86354>
- Winder, L., Phillips, C., Richards, N., Ochoa-Corona, F., Hardwick, S., Vink, C. J., & Goldson, S. (2011). Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 312–320. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00079.x>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms, 74(11), 5088–5090. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC432104/pdf/pnas00033-0388.pdf>
- Wolgemuth, C. W. (2015). Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46, 104–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.015>
- Wunder Jr, E. A., Figueira, C. P., Benaroudj, N., Hu, B., Tong, B. A., Trajtenberg, F., ... Ko, A. I. (2016). A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete HHS Public Access. *Mol Microbiol*, 101(3), 457–470. <https://doi.org/10.1111/mmi.13403>

- Yang, C.-W., Hung, C.-C., Wu, M.-S., Tian, Y.-C., Chang, C.-T., Pan, M.-J., & Vandewalle, A. (2006). Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney International*, 695000119, 815–822. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000119>
- Żmudzki, J., Jabłoński, A., Nowak, A., Zębek, S., Arent, Z., Bocian, Ł., & Pejsak, Z. (2016). First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0186-7>
- Zarantonelli, L; Suanes, A; Meny, P; Buroni, F; Nieves, C; Salaberry, X; Briano, C; Ashfield, N; Da Silva Silveira, C; Dutra, F; Easton, C; Fraga, M; Giannitti, F; Hamond, C; Macías-Rioseco, M; Menéndez, C; Mortola, A; Picardeau, M; Quintero, J; Ríos, C; Rodríguez, V; Romero, A; Varela, G; Rivero, R; Schelotto, F; Riet-Correa, F; Buschiazzo, A. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLOS Neglected Disease*, ACCEPTED.

9. ANEXOS

Tabla A.1. Genes encontrados en el genoma de aislamientos individuales, y ausentes en los restantes 39 genomas.

No se incluyeron aquellos genes codificantes para proteínas hipotéticas.

Gen	Anotación
group_402	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
group_403	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
group_1076	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
kduD	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase
group_735	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase
group_10237	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase
group_699	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase
group_9848	3'-5' exoribonuclease
group_10113	3-aminobutyryl-CoA aminotransferase
aroB_1	3-dehydroquinate synthase
group_9843	3-deoxy-alpha-D-manno-octulosonate 8-oxidase
group_10539	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase KdsC
group_9860	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase
leuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
group_9862	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG
group_10171	6-hydroxy-3-succinoylpyridine 3-monooxygenase HspA
group_10456	6-phosphogluconolactonase
group_8643	7-cyano-7-deazaguanine synthase
group_10724	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit
adoK	Adenosine kinase
kgfP	Alpha-ketoglutarate permease
dcuA	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuA
group_231	ankyrin repeat-containing protein
group_234	ankyrin repeat-containing protein
group_837	ankyrin repeat-containing protein
group_10363	Antitoxin EndoAI
higA	Antitoxin HigA
group_11055	AraC family transcriptional regulator
group_11139	AraC family transcriptional regulator
group_9948	AraC family transcriptional regulator
group_665	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
group_1105	ATP-dependent DNA helicase PcrA
group_254	ATP-dependent DNA helicase RecG
group_255	ATP-dependent DNA helicase RecG
recG_2	ATP-dependent DNA helicase RecG
group_257	ATP-dependent DNA helicase RecG
group_258	ATP-dependent DNA helicase RecG
npr	Bacillolysin
hldE_1	Bifunctional protein HldE
group_982	Blue-light-activated protein
group_983	Blue-light-activated protein
group_984	Blue-light-activated protein
carB_1	Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific large chain
katG	Catalase-peroxidase
htpG_2	Chaperone protein HtpG
cat_1	Chloramphenicol acetyltransferase
kfoC	Chondroitin synthase
parA_4	Chromosome+partitioning+protein+ParA
group_11113	Chromosome-partitioning protein Spo0J
group_686	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA

group_688	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA
group_690	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA
group_692	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA
group_11065	CRISPR system Cascade subunit CasC
group_11131	cyclic nucleotide-binding protein
moaA	Cyclic pyranopterin monophosphate synthase
group_326	Cyclic-di-AMP phosphodiesterase PgpH
group_9831	Cytidylyltransferase
novN	Decarbamoylnovobiocin carbamoyltransferase
hemB_2	Delta-aminolevulinic+acid+dehydratase
group_9837	D-glycero-alpha-D-manno-heptose 1-phosphate guanylyltransferase
group_540	DNA ligase
group_10585	DNA methylase
group_11049	DNA primase
group_539	DNA+ligase
group_9821	dTDP-3-amino-3,4,6-trideoxy-alpha-D-glucose transaminase
group_9822	dTDP-3-amino-3,4,6-trideoxy-alpha-D-glucose transaminase
rfbC_1	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase
rmlD	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
group_9812	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
rfbB_1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
strE_2	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
group_10551	E3 ubiquitin-protein ligase SlrP
group_10196	E3 ubiquitin-protein ligase SspH1
group_10399	E3 ubiquitin-protein ligase SspH1
group_11059	E3 ubiquitin-protein ligase SspH1
group_10446	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_10640	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_10751	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_10846	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_11034	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_9990	E3 ubiquitin-protein ligase sspH2
group_8463	E3+ubiquitin-protein+ligase+SlrP
group_8947	E3+ubiquitin-protein+ligase+SlrP
group_9124	E3+ubiquitin-protein+ligase+SlrP
group_9027	E3+ubiquitin-protein+ligase+SspH1
group_588	ECF RNA polymerase sigma factor SigX
pdxB_1	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase
group_1235	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase
espL	ESX-1 secretion-associated protein EspL
group_8254	FR47-like protein
group_10106	Fructose-1,6-bisphosphatase/inositol-1-monophosphatase
group_1041	FtsX-like permease family protein
group_1042	FtsX-like permease family protein
group_1043	FtsX-like permease family protein
group_1044	FtsX-like permease family protein
group_9836	GDP/UDP-N,N'-diacetylbacillosamine 2-epimerase (hydrolyzing)
group_9826	GDP-6-deoxy-D-mannose reductase
tld	GDP-6-deoxy-D-talose 4-dehydrogenase
fcl_1	GDP-L-fucose synthase
group_10121	GDP-perosamine synthase
perA	GDP-perosamine synthase
group_9841	GDP-perosamine synthase
group_1212	Glucans biosynthesis protein C

group_1213	Glucans biosynthesis protein C
group_9861	Glucose--fructose oxidoreductase
nrdH	Glutaredoxin-like protein NrdH
group_1072	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]
group_1073	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]
group_10942	Glycyl-glycine endopeptidase ALE-1
group_348	Glycyl-glycine endopeptidase ALE-1
ltrA_1	Group II intron-encoded protein LtrA
ltrA_2	Group II intron-encoded protein LtrA
group_1476	Group II intron-encoded protein LtrA
group_9830	Heterocyst differentiation ATP-binding protein HepA
hisC_1	Histidinol-phosphate aminotransferase
group_9992	HTH-type transcriptional regulator Xre
group_9864	Hydroxypyruvate reductase
group_10850	Inherit from bactNOG: adenine specific DNA methyltransferase
group_10851	Inherit from bactNOG: adenine specific DNA methyltransferase
group_10904	Inherit from bactNOG: adenine specific DNA methyltransferase
group_9847	Inherit from bactNOG: gCN5-related N-acetyltransferase
group_10364	Inherit from bactNOG: Nucleic acid binding protein
group_293	Inherit from bactNOG: Transposase
ybcI_2	Inner membrane protein YbcI
group_560	Inner+membrane+protein+YbcI
group_360	Insertion element uncharacterized 12.0 kDa protein
group_361	Insertion element uncharacterized 12.0 kDa protein
group_363	Insertion element uncharacterized 12.0 kDa protein
group_10660	Integrase catalytic subunit
group_10791	Integrase catalytic subunit
group_115	Integrase catalytic subunit
group_119	Integrase catalytic subunit
group_122	Integrase catalytic subunit
group_123	Integrase catalytic subunit
group_125	Integrase catalytic subunit
group_126	Integrase catalytic subunit
group_127	Integrase catalytic subunit
group_128	Integrase catalytic subunit
group_129	Integrase catalytic subunit
group_1506	Integrase catalytic subunit
group_745	Integrase catalytic subunit
group_746	Integrase catalytic subunit
group_8302	Integrase catalytic subunit
group_9817	Integrase catalytic subunit
group_577	Integrase core domain protein
kynB	Kynurenine formamidase
group_11140	LemA family protein
lexA_2	LexA+repressor
group_73	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase FadD15
group_10498	LysM domain M23 M37 peptidase domain protein
group_9850	Macrocin-O-methyltransferase (TylF)
metJ	Met repressor
group_10198	Methionine aminopeptidase
fmt_1	Methionyl-tRNA formyltransferase
group_1392	Methyl-accepting chemotaxis
group_1393	Methyl-accepting chemotaxis
group_1394	Methyl-accepting chemotaxis

group_156	Methyl-accepting chemotaxis
group_157	Methyl-accepting chemotaxis
group_164	Methyl-accepting chemotaxis
mutB_1	Methylmalonyl-CoA mutase large subunit
group_10128	Methyltransferase
group_10421	Methyltransferase
group_10112	Methyltransferase domain protein
group_10122	Methyltransferase domain protein
group_10124	Methyltransferase domain protein
bamHIM	Modification methylase BamHI
higB	mRNA interferase HigB
mepM_10	Murein DD-endopeptidase MepM
envC_2	Murein hydrolase activator EnvC
mycF	Mycinamicin III 3"-O-methyltransferase
group_10108	N,N'-diacetyllegionaminic acid synthase
group_9835	N,N'-diacetyllegionaminic acid synthase
group_9840	N,N'-diacetyllegionaminic acid synthase
bshA_2	N-acetyl-alpha-D-glucosaminyL+L-malate+synthase
group_9838	N-acylneuraminate cytidylyltransferase
group_9842	N-acylneuraminate cytidylyltransferase
nox	NADH oxidase
group_10603	NADH-quinone oxidoreductase subunit J
group_687	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
group_689	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
group_691	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
group_693	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
group_961	PAS fold protein
group_963	PAS fold protein
group_964	PAS fold protein
group_965	PAS fold protein
group_10587	peptidase
group_8310	Peptidase membrane zinc metallopeptidase
group_10425	Phage protein Gp37/Gp68
group_11026	Phage protein Gp37/Gp68
group_1103	phosphatase
group_1131	phosphatase
group_1132	phosphatase
group_1133	phosphatase
group_639	Phosphoethanolamine transferase EptC
group_10378	Phospholipase C
group_10206	Phosphoserine phosphatase RsbU
group_418	photo-lyase
group_421	photo-lyase
group_422	photo-lyase
group_10159	PilT protein domain-containing protein
group_8318	Polysialic acid O-acetyltransferase
punA	Purine nucleoside phosphorylase
group_8255	putative ABC transporter permease
group_619	Putative acyltransferase
group_590	putative GMC-type oxidoreductase
group_591	putative GMC-type oxidoreductase
group_10118	Putative multidrug export ATP-binding/permease protein
bshB2	putative N-acetyl-alpha-D-glucosaminyL L-malate deacetylase 2
group_10114	putative oxidoreductase

group_10559	Putative phosphoribosyl transferase
tpx_1	putative thiol peroxidase
group_941	putative transcriptional regulatory protein pdtaR
group_943	putative transcriptional regulatory protein pdtaR
group_10166	Putative transposase, YhgA-like
group_10341	Putative transposase, YhgA-like
group_10368	Putative transposase, YhgA-like
group_10665	Putative transposase, YhgA-like
group_10675	Putative transposase, YhgA-like
group_10680	Putative transposase, YhgA-like
group_10744	Putative transposase, YhgA-like
group_10838	Putative transposase, YhgA-like
group_10905	Putative transposase, YhgA-like
group_10907	Putative transposase, YhgA-like
group_11133	Putative transposase, YhgA-like
group_11141	Putative transposase, YhgA-like
group_11142	Putative transposase, YhgA-like
group_273	Putative transposase, YhgA-like
group_274	Putative transposase, YhgA-like
group_275	Putative transposase, YhgA-like
group_276	Putative transposase, YhgA-like
group_277	Putative transposase, YhgA-like
group_278	Putative transposase, YhgA-like
group_316	Putative transposase, YhgA-like
group_317	Putative transposase, YhgA-like
group_10186	Putative type-1 restriction enzyme specificity protein MPN_089
group_10312	Putative type-1 restriction enzyme specificity protein MPN_089
group_10454	Putative type-1 restriction enzyme specificity protein MPN_089
group_10780	Putative type-1 restriction enzyme specificity protein MPN_089
group_9975	Putative type-1 restriction enzyme specificity protein MPN_089
group_1048	Regulator of RpoS
group_10638	RelA SpoT domain protein
group_10040	repeat protein
group_10500	repeat protein
group_10501	repeat protein
group_10554	repeat protein
group_10641	repeat protein
group_10704	repeat protein
group_303	repeat protein
group_11068	repeat-containing protein
group_11072	repeat-containing protein
group_447	repeat-containing protein
dnaB	Replicative DNA helicase
group_514	Restriction
group_1474	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)
group_1475	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)
group_10855	Rhomboid protease GluP
group_1154	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K
group_9856	scyllo-inositol 2-dehydrogenase (NAD(+))
group_223	Sensor protein CreC
group_10897	Sporulation initiation inhibitor protein Soj
group_11114	Sporulation initiation inhibitor protein Soj
yidA_2	Sugar phosphatase YidA
group_1318	Sugar phosphatase YidA

group_948	Swarming motility protein SwrC
fdtA_1	TDP-4-oxo-6-deoxy-alpha-D-glucose-3,4-oxoisomerase
lpxK_2	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase
nprS	Thermolysin
group_10792	Thermostable neutral protease NprT
thrS	Threonine--tRNA ligase
tsaC	Threonylcarbamoyl-AMP synthase
group_9858	Trans-aconitate 2-methyltransferase
group_501	Transcriptional regulatory protein CreB
group_502	Transcriptional regulatory protein CreB
ypdB	Transcriptional regulatory protein YpdB
mfd_2	Transcription-repair-coupling factor
group_10410	Transposase
group_10644	Transposase
group_11121	Transposase
group_184	Transposase
group_185	Transposase
group_186	Transposase
group_333	Transposase
group_334	Transposase
group_9797	Transposase
group_429	Transposase for transposon Tn5
tnpA_3	Transposase for transposon Tn5
group_431	Transposase for transposon Tn5
group_432	Transposase for transposon Tn5
group_359	transposase IS3 IS911 family protein
group_10334	Transposase
group_11174	Transposase
group_11175	Transposase
group_11176	Transposase
group_11180	Transposase
group_11184	Transposase
group_11186	Transposase
group_11189	Transposase
group_11193	Transposase
group_11205	Transposase
group_11206	Transposase
group_1271	Transposase
group_132	Transposase
group_133	Transposase
group_136	Transposase
group_137	Transposase
group_138	Transposase
group_139	Transposase
group_140	Transposase
group_141	Transposase
group_152	Transposase
group_154	Transposase
group_74	Transposase
group_80	Transposase
group_86	Transposase
wapA_6	tRNA nuclease WapA
tilS_1	tRNA(Ile)-lysidine synthase
group_9736	tRNA+nuclease+WapA

group_29	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
group_31	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
group_33	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
wapA_9	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
wapA_3	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
group_38	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
group_821	tRNA3(Ser)-specific nuclease WapA
group_9414	Type+IIS+restriction+enzyme+Eco57I
bamHIR	Type-2 restriction enzyme BamHI
group_10803	Tyrosine recombinase XerC
group_487	Tyrosine recombinase XerC
group_488	Tyrosine recombinase XerC
group_489	Tyrosine recombinase XerC
group_490	Tyrosine recombinase XerC
xerD_1	Tyrosine recombinase XerD
group_10305	Tyrosine recombinase XerD
group_10637	Tyrosine recombinase XerD
group_10126	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_9813	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_9820	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_9845	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_9853	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_9857	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase
group_10115	UDP-4-amino-4,6-dideoxy-N-acetyl-beta-L-altrosamine transaminase
group_9875	UDP-Glc:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-glucosyltransferase WfgD
group_10120	UDP-N-acetylbaucillosamine N-acetyltransferase
group_10871	YD repeat-containing protein
group_11038	YD repeat-containing protein
group_1229	YD repeat-containing protein
group_1230	YD repeat-containing protein
group_1231	YD repeat-containing protein
group_30	YD repeat-containing protein
group_11011	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase

Tabla A.2. Genes encontrados en todos los aislamientos (*core genome*). No se incluyeron aquellos genes codificantes para proteínas hipotéticas. Los genes que se encuentran resaltados son los incluidos en los diferentes esquemas MLST.

Gen	Anotación
ramA_1	(R)-stereoselective amidase
dhaT	1,3-propanediol dehydrogenase
groS	10 kDa chaperonin
rrs	16S ribosomal RNA
pfkB	2-dehydro-3-deoxygluconokinase
leuA_1	2-isopropylmalate synthase
leuA_2	2-isopropylmalate synthase
sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
bfmBAB	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta
rpsA	30S ribosomal protein S1
rpsJ	30S ribosomal protein S10
rpsK	30S ribosomal protein S11
rpsL	30S ribosomal protein S12
rpsM	30S ribosomal protein S13
rpsO	30S ribosomal protein S15
rpsR	30S ribosomal protein S18
rpsS	30S ribosomal protein S19
rpsU	30S ribosomal protein S21
rpsC	30S ribosomal protein S3
rpsD	30S ribosomal protein S4
rpsE	30S ribosomal protein S5
rpsG	30S ribosomal protein S7
rpsH	30S ribosomal protein S8
rpsI	30S ribosomal protein S9
leuB	3-isopropylmalate dehydrogenase
fabG_1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG
rplK	50S ribosomal protein L11
rplN	50S ribosomal protein L14
rplP	50S ribosomal protein L16
rplB	50S ribosomal protein L2
rplT	50S ribosomal protein L20
rplU	50S ribosomal protein L21
rplV	50S ribosomal protein L22
rplW	50S ribosomal protein L23
rplY	50S ribosomal protein L25
rpmA	50S ribosomal protein L27
rpmB	50S ribosomal protein L28
rpmD	50S ribosomal protein L30
rpmE	50S ribosomal protein L31
rpmF	50S ribosomal protein L32
rpmH	50S ribosomal protein L34
rplE	50S ribosomal protein L5
rplF	50S ribosomal protein L6
groL	60 kDa chaperonin
group_891	ABC transporter
ilvH	Acetolactate synthase small subunit
phbA	Acetyl-CoA acetyltransferase
caiB	Acetyl-CoA:oxalate CoA-transferase
citB	Aconitate hydratase A
acpP	Acyl carrier protein

mmgC_1	Acyl-CoA dehydrogenase
mmgC_3	Acyl-CoA dehydrogenase
ahcY	Adenosylhomocysteinase
adk	Adenylate kinase
group_1822	alpha beta
purF	Amidophosphoribosyltransferase
rsbV_3	Anti-sigma-B factor antagonist
rsbV_5	Anti-sigma-B factor antagonist
rsbV_2	Anti-sigma-B factor antagonist
rsbV_4	Anti-sigma-B factor antagonist
gatB	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B
hisG	ATP phosphoribosyltransferase
atpA	ATP synthase subunit alpha
atpD	ATP synthase subunit beta
atpE	ATP synthase subunit c
clpC	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
clpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
clpP_2	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
clpP_1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
hslV	ATP-dependent protease subunit HslV
ftsH	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
pcaF	Beta-ketoadipyl-CoA thiolase
cysNC	Bifunctional enzyme CysN/CysC
glmU	Bifunctional protein GlmU
exbD_1	Biopolymer transport protein ExbD
ilvE	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
carE	Caffeoyl-CoA reductase-Etf complex subunit CarE
group_1793	Calcineurin-like phosphoesterase
carB	Carbamoyl-phosphate synthase large chain
dnaK	Chaperone protein DnaK
cheD_1	Chemoreceptor glutamine deamidase CheD
cheY_2	Chemotaxis protein CheY
cheY_3	Chemotaxis protein CheY
pomA_1	Chemotaxis protein PomA
cheX	CheY-P phosphatase CheX
parA	Chromosome partitioning protein ParA
gltA2_2	Citrate synthase 1
gltA2_1	Citrate synthase 1
glxR	CRP-like cAMP-activated global transcriptional regulator
crp_1	CRP-like cAMP-activated global transcriptional regulator
cysK	Cysteine synthase
ctaD	Cytochrome c oxidase subunit 1
ilvD	Dihydroxy-acid dehydratase
gyrA_1	DNA gyrase subunit A
gyrA_2	DNA gyrase subunit A
gyrB_2	DNA gyrase subunit B
group_900	DNA repair protein radc
bolA_2	DNA-binding transcriptional regulator Bola
rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
rpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
rpoE_1	ECF RNA polymerase sigma-E factor
etfB	Electron transfer flavoprotein subunit beta
fusA_2	Elongation factor G

efp	Elongation factor P
tsf	Elongation factor Ts
tufA	Elongation factor Tu
eno	Enolase
fdx4	Ferredoxin, 2Fe-2S
fur	Ferric uptake regulation protein
sufB	FeS cluster assembly protein SufB
group_1574	Flagellar basal body-associated protein FliL
flgC	Flagellar basal-body rod protein FlgC
flgG_1	Flagellar basal-body rod protein FlgG
flhA	Flagellar biosynthesis protein FlhA
fliP	Flagellar biosynthetic protein FliP
fliR	Flagellar biosynthetic protein FliR
flaB_1	Flagellar filament 35 kDa core protein
flaB_5	Flagellar filament 35 kDa core protein
flaB_2	Flagellar filament 35 kDa core protein
group_11228	Flagellar filament 35 kDa core protein
flaB_4	Flagellar filament 35 kDa core protein
flgE	Flagellar hook protein FlgE
flgK	Flagellar hook-associated protein 1
group_1575	flagellar motor protein MotB
fliG_3	Flagellar motor switch protein FliG
fliM	Flagellar motor switch protein FliM
fliF	Flagellar M-ring protein
ylxH	Flagellum site-determining protein YlxH
fliI	Flagellum-specific ATP synthase
fbp_2	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1
suhB_2	Fructose-1,6-bisphosphatase/inositol-1-monophosphatase
fbaB	Fructose-bisphosphate aldolase class 1
fumC	Fumarate hydratase class II
frdA	Fumarate reductase flavoprotein subunit
frdB	Fumarate reductase iron-sulfur subunit
gmd	GDP-mannose 4,6-dehydratase
glnA	Glutamine synthetase
glmS	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]
gpsA_2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]
glyQS	Glycine--tRNA ligase
relA	GTP pyrophosphokinase
typA	GTP-binding protein TypA/BipA
group_604	hd domain protein
hrcA	Heat-inducible transcription repressor HrcA
group_1524	Helicase
ruvB	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB
metX	Homoserine O-acetyltransferase
hprK	HPr kinase/phosphorylase
crh	HPr-like protein Crh
sutR	HTH-type transcriptional regulator SutR
lipL41	hypothetical protein
hisB	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
group_1005	Inherit from bactNOG: virion core protein (Lumpy skin disease
ppa	Inorganic pyrophosphatase
guaB	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
icd_1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
icd_2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]

ilvC	Ketol-acid reductoisomerase
lutA	Lactate utilization protein A
lexA	LexA repressor
bcsC	Lipopolysaccharide assembly protein B
lptB	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB
lspA	Lipoprotein signal peptidase
lolD_2	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD
lolE_2	Lipoprotein-releasing system transmembrane protein LolE
mcl1	L-malyl-CoA/beta-methylmalyl-CoA lyase
lon_1	Lon protease
group_862	Major facilitator superfamily protein
lipL32	Major outer membrane protein
group_1785	Major outer membrane protein
group_1529	Methionine biosynthesis protein MetW
pccB_2	Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase 12S subunit
mepM_5	Murein DD-endopeptidase MepM
mepM_9	Murein DD-endopeptidase MepM
pntA_1	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha
pntA_2	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha
ndhC	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3
nqo1	NADH-quinone oxidoreductase subunit 1
nqo4	NADH-quinone oxidoreductase subunit 4
nqo9	NADH-quinone oxidoreductase subunit 9
nuoB	NADH-quinone oxidoreductase subunit B
nuoH	NADH-quinone oxidoreductase subunit H
nuoK	NADH-quinone oxidoreductase subunit K
vnfA	Nitrogen fixation protein VnfA
glnB	Nitrogen regulatory protein P-II
ndk	Nucleoside diphosphate kinase
lolA_2	Outer-membrane lipoprotein carrier protein
mrcA_2	Penicillin-binding protein 1A
prfC	Peptide chain release factor 3
pth_2	Peptidyl-tRNA hydrolase
pheS	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit
ybeZ	PhoH-like protein
aroF	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
pckA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]
group_972	Phospholipid glycerol acyltransferase
coaD	Phosphopantetheine adenylyltransferase
purS	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS
group_853	Plays a role in the regulation of phosphate uptake (By similarity)
speE_1	Polyamine aminopropyltransferase
pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
pccB	Propionyl-CoA carboxylase beta chain
htpX	Protease HtpX
recA	Protein RecA
secY	Protein translocase subunit SecY
fruA	PTS system fructose-specific EIIABC component
fadN	putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
ybiT	putative ABC transporter ATP-binding protein YbiT
group_11154	Putative anti-sigma factor antagonist
group_1521	Putative anti-sigma factor antagonist
btrV	Putative anti-sigma factor antagonist BtrV
flaAL_1	Putative flagellar filament outer layer-like protein

engB	putative GTP-binding protein EngB
hppA1	Putative K(+)-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump
group_1067	putative NTE family protein
tsaA	putative peroxiredoxin
htrA	Putative serine protease HtrA
hxcR	putative type II secretion system protein HxcR
pyk_1	Pyruvate kinase
qoxC	Quinol oxidase subunit 3
dnaC_2	Replicative DNA helicase
ribBA	Riboflavin biosynthesis protein RibBA
rbn_1	Ribonuclease BN
rnd_1	Ribonuclease D
rnd_2	Ribonuclease D
hpf	Ribosome hibernation promoting factor
ychF	Ribosome-binding ATPase YchF
fliA	RNA polymerase sigma factor FliA
rpoD	RNA polymerase sigma factor RpoD
carD	RNA polymerase-binding transcription factor CarD
group_1018	Rod shape-determining protein (MreD)
mreB	Rod shape-determining protein MreB
mreA	Rod shape-determining protein RodA
speH	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme
metK	S-adenosylmethionine synthase
scpB	Segregation and condensation protein B
regX3	Sensory transduction protein regX3
group_1703	Single-stranded nucleic acid binding R3H domain-containing protein
soj_2	Sporulation initiation inhibitor protein Soj
group_1648	stage II sporulation protein
sucD	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha
sucC	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta
cysD	Sulfate adenylyltransferase subunit 2
group_11218	Thioesterase superfamily protein
trxA	Thioredoxin
group_1723	TPR domain-containing protein
tal	Transaldolase
hlyU	Transcriptional activator HlyU
degU_2	Transcriptional regulatory protein DegU
zraR_1	Transcriptional regulatory protein ZraR
infA	Translation initiation factor IF-1
infC	Translation initiation factor IF-3
tpiA	Triosephosphate isomerase
gyrB_1	Type 2 topoisomerase subunit B
epsF	Type II secretion system protein F
xerC_2	Tyrosine recombinase XerC
murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
group_870	Undecaprenyl-phosphate mannosyltransferase
pyrH	Uridylate kinase
uvrA	UvrABC system protein A
yscL	Yop proteins translocation protein L

Parte de los resultados de esta tesis fueron incluidos en el siguiente manuscrito que ha sido recientemente aceptado para su publicación:

- Zarantonelli, L; Suanes, A; Meny, P; Buroni, F; Nieves, C; Salaberry, X; Briano, C; Ashfield, N; Da Silva Silveira, C; Dutra, F; Easton, C; Fraga, M; Giannitti, F; Hamond, C; Macías-Rioseco, M; Menéndez, C; Mortola, A; Picardeau, M; Quintero, J; Ríos, C; Rodríguez, V; Romero, A; Varela, G; Rivero, R; Schelotto, F; Riet-Correa, F; Buschiazzo, A. (2018). “Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis”. *PLOS Neglected Tropical Disease*.

Otros resultados han sido incluidos en los siguientes manuscritos que serán de brevemente publicados:

- Nieves, C., Hamond C., et al. (2018). “Potential role of wild boars as a reservoir for leptospirosis in Uruguay”. Enviado para publicación a la revista *Emerging Infectious Diseases*
- Nieves, C et al. “Closed genomes of *Leptospira noguchii* strains isolated from infected cattle reveal unusual genotypic variation” Manuscrito en preparación

Otras contribuciones:

- Hamond, C., S. Silveira, C., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Aráoz, V., A. Costa, R., Rivero, R., Giannitti, F., Zarantonelli, L. “Two outbreaks of acute infection by *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki in sheep”. 2018 Enviado a publicación a la revista *Transboundary and Emerging Diseases*
- Hamond, C., Mannise, N., Nieves, C., Cabrera, A., Riet-Correa, F., González, S., Zarantonelli, L. “Genotyping of *Leptospira* directly from a kidney sample of fox (sp) demonstrates similarity with strains isolated from cattle and human with acute disease”. Manuscrito en preparación

1 **Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay**
2 **reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis**

3
4 Short title: **Isolation of *Leptospira* strains from Uruguayan cattle**

5
6 Leticia Zarantonelli^{1,2¶}, Alejandra Suanes^{3¶}, Paulina Meny^{4¶}, Florencia Buroni^{5¶}, Cecilia
7 Nieves^{1&}, Ximena Salaberry^{3&}, Carolina Briano^{6&}, Natalia Ashfield⁴, Caroline Da Silva
8 Silveira⁷, Fernando Dutra⁶, Cristina Easton³, Martin Fraga⁷, Federico Giannitti⁷, Camila
9 Hamond^{2,7}, Melissa Macías-Rioseco⁷, Clara Menéndez⁴, Alberto Mortola³, Mathieu
10 Picardeau^{8,9}, Jair Quintero⁴, Cristina Ríos⁴, Víctor Rodríguez⁵, Agustín Romero⁶, Gustavo
11 Varela⁴, Rodolfo Rivero^{5*}, Felipe Schelotto^{4*}, Franklin Riet-Correa^{7*} and Alejandro
12 Buschiazzo^{1,9,10*}, on behalf of the Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis
13 Consortium[^]

14
15 ¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo,
16 Montevideo, Uruguay

17 ²Unidad Mixta UMPI, Institut Pasteur de Montevideo + Instituto Nacional de Investigación
18 Agropecuaria INIA, Montevideo, Uruguay

19 ³Departamento de Bacteriología, División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Sede
20 Central, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay

21 ⁴Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina,
22 Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

23 ⁵División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Noroeste,
24 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Paysandú, Uruguay

25 ⁶División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Este, Ministerio
26 de Ganadería, Agricultura y Pesca, Treinta y Tres, Uruguay

27 ⁷Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Estación Experimental La Estanzuela,
28 Colonia, Uruguay

29 ⁸Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France,

30 ⁹Joint International Unit « Integrative Microbiology of Zoonotic Agents » IMiZA, Institut
31 Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) / Institut Pasteur (Paris, France)

32 ¹⁰Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France

33

34 * Corresponding authors:

35 E-mail: rrivero@mgap.gub.uy (RR)

36 E-mail: felipe@higiene.edu.uy (FS)

37 E-mail: frcorrea@inia.org.uy (FR-C)

38 E-mail: alebus@pasteur.edu.uy (AB)

39

40 ¶ These authors contributed equally to this work

41 & These authors also contributed equally to this work

42

43 ^ Membership of the Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium is
44 provided in the Supporting Information.

45 **Abstract**

46 Leptospirosis is a neglected zoonosis with worldwide distribution. The causative agents are
47 spirochete bacteria of the *Leptospira* genus, displaying huge diversity of serovars, the identity
48 of which is critical for effective diagnosis and vaccination purposes. Among many other
49 mammalian species, *Leptospira* infects cattle, eliciting acute signs in calves, and chronic
50 disease in adult animals often leading to abortions. In South America, and including in Uruguay,
51 beef and dairy export are leading sources of national income. Despite the importance of bovine
52 health, food safety, and bovine-related dissemination of leptospirosis to humans, extremely
53 limited information is available as to the identity of *Leptospira* species and serovars infecting
54 cattle in Uruguay and the South American subcontinent. Here we report a multicentric 3-year
55 study resulting in the isolation and detailed characterization of 40 strains of *Leptospira* spp.
56 obtained from infected cattle. Combined serologic and molecular typing identified these
57 isolates as *L. interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki (20 strains), *L. interrogans*
58 serogroup Canicola serovar Canicola (1 strain), *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar
59 Hardjo (10 strains) and *L. noguchii* (9 strains). The latter showed remarkable phenotypic and
60 genetic variability, belonging to 6 distinct serogroups, including 3 that did not react with a large
61 panel of reference serogrouping antisera. Approximately 20% of cattle sampled in the field
62 were found to be shedding pathogenic *Leptospira* in their urine, uncovering a threat for public
63 health that is being largely neglected. The two *L. interrogans* serovars that we isolated from
64 cattle displayed identical genetic signatures to those of human isolates that had previously been
65 obtained from leptospirosis patients. This report of local *Leptospira* strains shall improve
66 diagnostic tools and the understanding of leptospirosis epidemiology in South America. These
67 strains could also be used as new components within bacterin vaccines to protect against the
68 pathogenic *Leptospira* strains that are actually circulating, a direct measure to reduce the risk
69 of human leptospirosis.

70

71 **Author Summary**

72 Several species of the genus *Leptospira* cause leptospirosis, a disease that is transmitted from
73 animals to humans (zoonosis). Leptospirosis is the most extended zoonosis worldwide, with
74 over a million human cases each year. *Leptospira* spp. infect a broad range of wildlife and
75 domestic animals, including cattle. In several South American countries beef and dairy exports
76 rank among the most important national income sources, explaining why in Uruguay cattle
77 outnumber human population by a factor of 4. Yet, we did not know which *Leptospira* species
78 and serovariants (serovars) circulate among Uruguayan cattle. Current serologic diagnostic

79 methods and whole killed-cell vaccination approaches, critically depend on using the proper
80 serovars, which are hugely variable in *Leptospira* spp. from different regions of the world.
81 Through a multidisciplinary consortium effort, we now report the isolation and typing of 40
82 strains of pathogenic *Leptospira* spp. An unexpectedly large variation in terms of species and
83 serovars was found. These data are extremely important: 1- to improve diagnostics by updating
84 the available reference antigen panels; 2- to evaluate the efficacy of novel vaccines; and, 3- to
85 implement efficacious bovine vaccination as a means of reducing the incidence of bovine and
86 human leptospirosis.

87

88 **Introduction**

89 Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide importance caused by pathogenic spirochetes
90 belonging to the genus *Leptospira* [1]. It affects humans and a broad range of domestic animals
91 and wildlife. In cattle, leptospirosis is an important cause of reproductive failure, including
92 abortions and stillbirths [2]. Infected bovines also constitute an active reservoir for the spread
93 of the zoonotic disease, especially for humans in direct contact with infected animals including
94 veterinarians, abattoir and farm workers, hunters, as well as scientists handling laboratory
95 animals or during fieldwork [3, 4]. Domestic and wild animals are important reservoirs in rural
96 areas, unlike urban settings where rats play a major dissemination role [5, 6]. Human infection
97 with *Leptospira* spp. results from direct exposure if the source of infection is animal tissue,
98 body fluids or urine, and from indirect exposure if the source is environmental, such as soil or
99 urine-contaminated water. While the disease is endemic in many countries, it often presents as
100 epidemic outbreaks, causing severe, sometimes fatal disease in both humans and animals [7, 8].
101 Since the first systematic studies in 1960-1970, serologic studies in animals have repeatedly
102 shown high prevalence of exposure to *Leptospira* in Uruguay, with individual seropositivity in
103 the 25-50% range, and herd prevalence figures of 50-70% [9, 10]. Leptospirosis is considered
104 as a re-emerging bovine disease in Uruguay since 1998 [10], after what stricter epidemiologic
105 surveillance policies have been adopted by governmental agencies. Human leptospirosis has
106 been included into the official list of diseases of mandatory notification. Leptospirosis in
107 Uruguay is endemic, with limited epidemic outbreaks in rural areas. The annual incidence of
108 human leptospirosis is estimated at 15 per 100,000 [11], with precise figures not determined
109 due to under-reporting and extremely scarce systematic studies in southern Latin America of
110 morbidity/mortality burden [7]. The human disease appears to be associated with bovine
111 infection, as well as to rainfalls and floods [11], with recent isolation efforts revealing the
112 presence of three *L. interrogans* serovars, two *L. kirschneri* and one *L. borgpetersenii* [12, 13].

113 Despite the relevance of bovine leptospirosis as a cause of bovine abortions and infertility in
114 Uruguay, there have been no extensive studies on the actual identities of *Leptospira* species and
115 serovars obtained from animals in the field. There are currently no repositories of
116 autochthonous isolates available in the public domain, thus constraining vaccine companies to
117 the use of foreign strains as vaccine antigens. Even though Hardjo serovars have been suspected
118 for years to be involved in bovine infection cases [2, 14], to the best of our knowledge only four
119 *L. interrogans* and two *L. borgpetersenii* isolates belonging to this serovar have been reported
120 in South America [15-17] obtained in Brazil and Chile. An early study also reported six Hardjo
121 isolates in Argentina, without distinguishing the species [18], and two isolates of *L. interrogans*
122 Hardjo were also reported, one in sheep from Brazil [19] and one in cattle from Mexico [20].
123 We now report the first results of a multicentric effort, over the course of 3 years, aimed at
124 isolating pathogenic *Leptospira* strains in Uruguay, from infected cattle in the field and at
125 abattoirs. A detailed serologic and genetic characterization of such isolates uncovers a larger
126 than expected variety of *Leptospira* species and serovars. These data will be instrumental for
127 the design of better bacterin vaccines, as well as for improving diagnosis and epidemiologic
128 studies in Uruguay and neighboring South American countries.

129

130 **Methods**

131 **Ethics statement**

132 Urine and blood sampling from cattle in the field were performed by professional veterinarians,
133 respecting international recommendations for animal welfare, with approval granted by the
134 Ethics Committee for the Use of Animals for Experimentation (Comisión de Etica en el Uso de
135 Animales de Experimentación CEUA), DILAVE, Ministry of Livestock, Agriculture and
136 Fishery (Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca MGAP), Uruguay, according to national
137 law #18,611. Permission to take samples for the study was received from the animal owners
138 and the abattoirs.

139

140 **Identification of herds suspected of leptospirosis, and field urine and blood sampling.**

141 Forty-eight herds from both dairy and beef farms were sampled in this study, during a 33-month
142 period (Jan 2015-Sep 2017). Private veterinarians who suspected the disease sent the first
143 samples to our laboratory at the Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery. Following
144 current protocols in Uruguay, serum samples from 12 animals from each suspected herd, were
145 screened by the microscopic agglutination test (MAT) [21] for preexisting antibodies against
146 *Leptospira* (S1 Table). Farm selection for subsequent sample collection prioritized those herds

147 with presumptive diagnosis of leptospirosis (MAT titers ≥ 200 against ≥ 1 pathogenic
148 *Leptospira* reference serogroups). Farms with recorded history of abortions, infertility or acute
149 disease, were also prioritized. Selected farms were visited from January 2015 to September
150 2017, and individual blood and urine samples from 19 animals were collected (aiming for ≥ 1
151 seropositive animal with a 95% confidence interval, using a conservative seroprevalence figure
152 of $\geq 15\%$ on a reference population of 1000 individuals; seroprevalence estimates from
153 background serologic data in Uruguay are actually higher; the number of individual animals to
154 sample was calculated with the software WinEpi (<http://www.winepi.net>). Due to logistic
155 constraints, in a few cases the number of animals per herd was slightly higher, overall sampling
156 a total of 963 individual animals. Individuals to be sampled in each farm were selected
157 according to recorded history when available, prioritizing animals with clinical signs of acute
158 disease (especially calves with rectal temperature ≥ 39.5 °C, jaundice and/or hemoglobinuria),
159 previous antibody titers ≥ 200 by MAT, and/or history of abortions or infertility. If less than 19
160 animals met the latter criteria, additional animals (heifers or adult cows) from the same herd
161 were included to complete the required number. A questionnaire was distributed to farmers,
162 gathering information about history of leptospirosis and recent vaccination (<12 months) in the
163 farm.

164 Blood samples were collected by coccygeal venipuncture using 5 mL tubes with clot activator.
165 Sera were then stored at -20°C . Intramuscular administration of diuretics (~150 mg furosemide,
166 Furo R®, Ripoll) and thorough genital organ cleansing (wiping with 70% ethanol) preceded
167 urine collection from individual animals. Approximately 60 mL of midstream urine was
168 collected in sterile 120 mL containers (Bioset®, Medicplast).

169 Urine samples (100 μL) were inoculated in the field, immediately or within 2 h of sample
170 collection (for the rationale, see first section of Results), in 5 mL Ellinghausen-McCullough-
171 Johnson-Harris (EMJH) medium (prepared with *Leptospira* Medium Base EMJH [Gibco] and
172 albumin BovoLep [Bovogen Biologicals PTY Ltd]), supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-
173 fluorouracil (5-FU; Sigma) [21], and transported at 4°C to the laboratory together with the
174 corresponding blood/serum samples in Vacutainer tubes (Vacutainer®, BD-NJ, USA). In the
175 laboratory, two serial 1:50 dilutions were made from the first urine-inoculated tube, in 5 mL
176 EMJH medium supplemented with 5-FU (EMJH/FU), and all three dilutions were incubated at
177 29°C . The remaining volume of urine samples was conserved at 4°C for subsequent *lipL32* gene
178 amplification (see below). Sera were used to determine anti-*Leptospira* titers by MAT
179 following reported procedures [21]. Routine MAT tests used the national guide of positivity
180 cutoff at titers ≥ 200 . For comparison of reference vs local strains as MAT antigens (S5 Table),

181 sera from animals from which pathogenic *Leptospira* spp. were isolated (only from those herds
182 with no recent vaccination history, see Table 2) were tested by serial two-fold dilutions [21]
183 starting from 1:100. The local strains used for the latter MATs, were chosen to represent each
184 of the different serogroups identified in this work (IP1506001, IP1605021, IP1611024,
185 IP1611025, IP1512017, IP1703027, IP1711049 and IP1512011, according to the numbering
186 scheme defined in Table 1).

187

188 **Urine and kidney samples from abattoirs.** Random samples of urine (vesical puncture) and
189 kidneys were obtained at 22 slaughterhouses that received animals from geographic regions
190 throughout the country. No indications of reproductive failure nor of any other health problems
191 were recorded for slaughtered animals. Due to pipeline logistics at slaughterhouses, kidneys
192 and urine samples did not correspond to the same animal such that individual samples were
193 treated as independent. Urine samples were immediately inoculated in EMJH/FU, according to
194 the same protocol as with field samples. Kidneys were transported in 4°C-refrigerated boxes to
195 the laboratory and processed on arrival, 2-6 hours after sampling. A fragment of approximately
196 10 g of tissue, was placed in a funnel and surface-sterilized by dousing with alcohol and flamed
197 with a Bunsen burner. The tissue was then placed in a sterile stomacher bag and 10 mL of
198 phosphate-buffered saline (PBS) were aseptically added. After breaking the tissue down to a
199 pulp in the stomacher machine, the obtained suspension was allowed to settle for 15 minutes,
200 250 µL of supernatant were drawn and inoculated in 5 mL EMJH/FU (called tube A). From
201 tube A, 500 µL were transferred to a second 5 mL EMJH/FU tube (tube B), thus obtaining also
202 a 10-fold diluted culture. Finally, a third culture was also prepared from each sample by directly
203 inoculating 5 mL Fletcher medium with a small cylinder of kidney tissue obtained with a
204 Pasteur pipette. All cultures were incubated at 29°C.

205

206 **Culture conditions, isolation and conservation of *Leptospira* strains.** In order to define a
207 precise protocol for culture inoculation in the field after urine collection, decreasing numbers
208 of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Sponselee cells, ranging from 10^7 to 1 bacterium,
209 were incubated in 1 mL filter-sterilized bovine urine. After variable times, 100 µL urine were
210 inoculated in 5 mL EMJH for culture, and bacterial growth weekly monitored under a dark-
211 field microscope.

212 For isolations, *Leptospira* cultures were incubated at 29°C and observed under dark-field
213 microscopy weekly for up to 6 months [21]. In case of contamination by other microorganisms,
214 the cultures were filtrated through a 0.22 µm sterile syringe filter (Millipore Corporation, MA,

215 USA) and sub-cultured in fresh EMJH media. As soon as spirochete-like bacteria grew in
216 specific cultures, the presence of pathogenic *Leptospira* species was assessed by PCR
217 amplification of the *lipL32* gene (see below). Once no contamination observed, PCR-confirmed
218 cultures were sub-cultured in EMJH media without 5-FU until exponential growth phase.
219 *Leptospira* spp. isolates were then conserved at $\geq 10^8$ cells/mL in EMJH with 2.5% of dimethyl
220 sulfoxide (Sigma) and flash-cooled in liquid nitrogen.

221

222 ***lipL32* PCR in urine samples and positive cultures for *Leptospira*.** The *lipL32* gene was
223 chosen as a marker of pathogenic *Leptospira* species [22-24]. PCR amplification of *lipL32* was
224 performed using purified DNA from 10 mL of bovine urine samples. The urine was centrifuged
225 at 10,000 g for 15 min, the pellet rinsed once with PBS pH 7.4, and total DNA was extracted
226 with the PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen). *lipL32* PCR-amplification was
227 achieved using oligonucleotide primers *LipL32F* (5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3') and
228 *LipL32R* (5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3') [25]. The PCR was performed in 50 μ L 10
229 mM Tris.HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.25 mg/mL bovine serum
230 albumin (Sigma), 2 μ M oligonucleotide primers, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 5
231 μ L template DNA. PCR cycling comprised 1 denaturation step (5 min at 95 °C), 35
232 amplification cycles (each cycle 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 1 min at 72 °C) and a final
233 extension step (7 min at 72 °C). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis
234 and ethidium bromide staining, seeking for the expected 474 bp amplicon. Bovine serum
235 albumin (Sigma) was added in the PCR reaction mix, 0.25 mg/mL, greatly reducing sporadic
236 inhibitory effects of certain urine samples on the amplification reaction. An internal control was
237 always included to quantify this potential inhibition issue, by spiking analyzed samples with 40
238 ng of *L. borgpetersenii* DNA. Positive amplifications products were randomly chosen in a few
239 field samples, and sequenced confirming specific amplification of *Leptospira* DNA.

240 This *lipL32* PCR procedure was also performed to rank bacterial cultures (prioritizing more
241 careful follow-ups), after DNA purification from 1 mL of EMJH cultures where suspect
242 spirochetes had been observed by dark-field microscopy.

243

244 **Determination of *Leptospira* species by PCR amplification and partial sequencing of the**
245 **16S ribosomal RNA gene.** DNA from *Leptospira* spp. bovine and human isolates were purified
246 from 1 mL of EMJH culture using the PureLink® Genomic DNA MiniKit (Invitrogen). Primers
247 *LeptoA* (5'- GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') and *LeptoB* (5'-
248 TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') were used to amplify the 5'-terminal 331 bp fragment

249 of the 16S rRNA gene (*rrs*) as previously described [26]. The resulting amplicons were
250 sequenced in both senses using internal primers *LeptoC* (Forward) (5'-
251 CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3') and *Rs4* (Reverse)(5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-
252 3'). Sequence quality was verified with the Chromas software, and consensus sequences were
253 defined using BioEdit. All *rrs* sequences were deposited in GenBank (S2 Table). Consensus
254 sequences were then compared with available sequences in GenBank using BLAST.

255

256 **Multilocus variable-number tandem repeat analysis.** Multilocus variable-number tandem
257 repeat (VNTR) analyses were performed according to published methods [27] using five
258 discriminatory markers for VNTR loci 4, 7, 10, Lb4 and Lb5. Purified DNA from each isolate
259 was used to amplify the VNTR4, VNTR7 and VNTR10 loci in *L. interrogans*, and the
260 VNTR10, VNTRLb4 and VNTRLb5 loci in *L. borgpetersenii*. The GelAnalyzer 2010a
261 software (<http://www.gelanalyzer.com>) was used to analyze the ethidium bromide-stained
262 agarose electrophoresis gels, in which PCR products were resolved in parallel to 100-bp DNA
263 ladder (Thermo Scientific) as molecular weight marker. The number of repeats for each VNTR
264 locus was determined as: number of repeats = [PCR product size(bp) - flanking region (bp)] /
265 repeat unit length (bp).

266

267 **Partial *secY* gene sequencing and analysis.** DNA from *Leptospira* spp. bovine and human
268 isolates were purified from 1 mL of EMJH culture using the PureLink® Genomic DNA MiniKit
269 (Invitrogen). The *secY* gene was partially amplified by PCR with primers *SecYF* (5'-
270 ATGCCGATCATTGCTTC-3') and *SecYR* (5'-CCGTCCTTAATTTTAGACTTCTTC-
271 3') as described [28]. The resulting 549 bp amplicon was sequenced in both senses. Sequence
272 quality was verified with the Chromas software, and consensus sequences were defined using
273 BioEdit. All *secY* sequences were deposited in GenBank (S2 Table) and compared to those
274 available in PubMed, MLST (<https://pubmlst.org/leptospira>) and PATRIC
275 (<https://www.patricbrc.org>) [29] databases. The phylogenetic analyses based on *secY* sequences
276 were performed with MEGA 6.0 software (www.megasoftware.net) using the neighbor-joining
277 method. Phylogenetic trees were calculated using the Tamura-Neil model, and the reliability of
278 branches was validated by generating 1000 bootstrap replicates. Based on the analysis of
279 sequence similarities, *secY* genotypes were assigned.

280

281 **Serotyping.** To determine the serogroup of isolated *Leptospira* strains, MAT was used with a
282 panel of serogroup-specific rabbit antisera, spanning 24 *Leptospira* serogroups (KIT Royal

283 Tropical Institute, S3 Table), performed in microtiter plates, mixing equal volumes of viable
284 leptospire with serial 2-fold dilutions of each rabbit antiserum. After 2 h incubation at 37°C,
285 agglutination of bacteria was observed under dark-field microscopy. The strain's serogroup was
286 assigned according to the antiserum that gave highest agglutination titer. Based on the
287 combination of results from both serogroup determination and molecular typing (*rrs* gene
288 partial sequencing and VNTR analysis), a presumptive serovar was assigned to all isolates
289 belonging to *L. interrogans*, and *L. borgpetersenii* species, as previously described [27].
290

291 **Results**

292 **Bovine urine affects *Leptospira* viability.** Initial attempts to isolate *Leptospira* strains from
293 bovine urine samples were unsuccessful. The initial protocol was based on collecting the urine
294 from all sampled animals, and then inoculating them into the tubes with culture media. We
295 asked whether bacterial cell viability could be compromised due to exposure to urine over time.
296 As a first approach to address this issue, the particularly fastidious *L. borgpetersenii* serovar
297 Hardjo was chosen [30] to perform *in vitro* tests of viability kinetics in bovine urine. Indeed, a
298 critical maximum time of exposure was defined at less than 2 h (S4 Table), above which
299 subsequent isolation success rates decreased significantly. Although it cannot be ruled out that
300 other serovars might behave differently, based on these observations, all urine samples were
301 inoculated in the field within 2 h of collection, resulting in successful isolations.
302

303 **PCR screening of urine samples is key to prioritize culture follow-ups toward isolation.** A
304 second logistic challenge for isolation efforts from urine samples, was the high number of
305 cultures subject to follow-up under dark-field microscopy. PCR amplification of *Leptospira*
306 *lipL32* gene was optimized on bovine urine, eventually resulting in a robust method to prioritize
307 cultures (Fig 1), identifying those samples that proved positive for pathogenic *Leptospira* spp.
308 A strong inhibitory effect on *lipL32* PCR amplification was frequently observed, dependent on
309 the urine sample (Fig 1A). This sample-dependent inhibition issue was solved by washing the
310 bacterial pellet obtained after urine centrifugation with PBS pH 7.4 (Fig 1B), and then adding
311 bovine serum albumin in the PCR mix (Fig 1C). The sensitivity of this PCR method was ≥ 100
312 *Leptospira* cells, estimated by spiking known amounts of bacteria to sterile urine samples.
313 Specificity was assessed confirming a positive reaction with relevant serovars of pathogenic
314 *Leptospira* species (*L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii* and *L. santarosai*),
315 while undetectable with non-pathogenic *Leptospira* (*L. biflexa*) nor with unrelated species

316 (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and
317 *Enterococcus* sp.).

318

319 **Fig 1. Screening of pathogenic *Leptospira* spp. in urine samples by PCR amplification of**
320 **the *lipL32* gene.**

321 (A) PCR amplification of the *lipL32* gene, showing on the left side products obtained from 10
322 mL of urine without previous washing of the pellet, and on the right side the inhibition controls
323 using pure DNA spiking. (B) Same as (A), except that the urine pellets on the left side were
324 previously washed with PBS pH 7.4. (C) Same as (A) and (B), except that on the left side of
325 the ladder urine pellets were previously washed with PBS pH 7.4 and BSA was included in the
326 PCR mix. Asterisks show PCR reactions with total inhibition. (D) Typical *lipL32* amplification
327 results, using optimized conditions as in (C), from randomly chosen urine samples collected in
328 the field. (E) Corresponding inhibition controls for panel (D).

329

330 Using this screening strategy, the presence of pathogenic *Leptospira* spp. DNA was confirmed
331 in 193 urine samples, indicating that at least ~20 % (193/963) of all studied animals were
332 excreting pathogenic *Leptospira* in their urine (Fig 1D and E). False positive results from
333 collected samples are highly unlikely, considering that *lipL32* is only present in the genomes of
334 pathogenic *Leptospira* species [22], that no detectable amplification was observed with non-
335 specific bacteria, and that randomly chosen amplicons from bovine urine samples confirmed
336 100% sequence identity with *Leptospira lipL32*. An environmental source of pathogenic
337 bacteria during urine sample collection is highly unlikely as well, considering the sample
338 collection procedure and the number of bacteria needed to attain the PCR sensitivity threshold.
339 Following up with this approach at the herd level, 77 % of the farms (37/48) that were studied,
340 harbored ≥ 1 animal(s) excreting pathogenic *Leptospira*.

341

342 **Isolation of native strains of pathogenic *Leptospira* spp. infecting cattle.** The sampling
343 strategies, as detailed in Methods, were chosen to maximize the odds of isolating local strains
344 of pathogenic *Leptospira* spp. from infected cattle. A two-pronged approach was followed: i-
345 active and directed sampling in the field, at farms with suspicion of *Leptospira* infection; and,
346 ii- random postmortem sampling of animals at slaughterhouses.

347 *Field sampling.* A total of 48 farms representing both beef and dairy cattle herds were visited
348 from January 2015 to September 2017. They were distributed in 12 out of the 19 geographic
349 departments in which the Uruguayan territory is divided. A total of 963 urine samples were
350 collected and subjected to bacterial culture attempts and *lipL32* PCR screening. On average,

351 *Leptospira* growth was detected by dark-field microscopy on cultures after 28 days (range 7-56
352 days).

353 Cultures that showed suspect bacteria, were subjected to *lipL32* PCR amplification, initially
354 identifying 42 positive cultures from independent urine samples. Considering that 193 urine
355 samples were positive by PCR screening, an estimated recovery rate of 21.7% (42/193) positive
356 cultures from urine samples was achieved. From the original 42 positives, we ultimately
357 obtained 32 pure cultures of *Leptospira* spp. (Table 1) from field animals, representing a 76.2%
358 rate of success in isolating these bacteria from positive cultures, and a 3.3% global isolation
359 success rate when considering the whole set of input urine samples (32/963). This latter figure
360 should not be taken as a prevalence estimation of animals shedding leptospires (PCR-positive
361 urine samples is a better indicator), since challenges in cultivating these fastidious bacteria are
362 included in the global isolation rate.

363 *Sampling at abattoirs.* A total of 288 kidneys and 289 urine samples (representing 577
364 individual animals) were collected at slaughterhouses. According to the origin of slaughtered
365 animals, all 19 departments of the country were included. 18 positive cultures of *Leptospira*
366 were identified by dark-field microscopy and PCR amplification (*rrs* and *lipL32* genes), from
367 which 8 isolates were eventually obtained, 3 from urine and 5 from kidney samples (Table 1).

368

369 **Identification of autochthonous pathogenic *Leptospira* strains.** Overall, a total of 40 strains
370 of pathogenic *Leptospira* were isolated from cattle along the course of this study, and
371 characterized by combining serologic and molecular methods (Table 1). Recalling that initially
372 60 cultures had proved positive for *Leptospira* growth, the figures reveal that 20 could not be
373 isolated (10 from field animals and 10 from slaughterhouses), due to overgrowth by
374 contaminant species. Among the 40 characterized strains, 32 were isolated from live animals in
375 the field (30 from cows or heifers, and 2 from calves with signs of acute leptospirosis), and 8
376 from adult carcasses at abattoirs (Table 1).

Table 1. Identification of autochthonous *Leptospira* spp. isolates by combining serologic and molecular approaches.

Isolate number	Department	Source	Year of isolation	Species (by <i>rrs</i> sequence)	VNTR ^c (repeats profile)	Serogrouping (by MAT)	Presumptive serovar (by <i>rrs</i> + VNTR + MAT)	<i>secY</i> (genotype)
IP1507003	Paysandú*	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509008	Canelones**	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509009	Canelones**	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509010	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512011	Paysandú*	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512014	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512015	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512016	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1603018	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-0-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1609022	Artigas***	urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1610023	Lavalleja	urine ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1611026	Paysandú****	urine	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1703028	Paysandú	urine ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1703029	Paysandú	kidney ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710039	Artigas*****	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710040	Artigas*****	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710043	Artigas*****	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710044	Artigas*****	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710045	Artigas*****	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710047	Paysandú	urine	2017	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1710049	Treinta y Tres	kidney ^b	2017	<i>L. interrogans</i>	1-10-2	Canicola	Canicola	A
IP1506001	Canelones**	urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1509005	Salto*****	urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1509006	Salto*****	urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1512013	Salto*****	urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1605020	Canelones**	urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-5	Sejroe	Hardjo	B
IP1704030	Treinta y Tres*****	urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B

IP1704031	Treinta y Tres*****	urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1708034	Soriano	urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1708036	San José	kidney ^a	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1709038	Cerro Largo	kidney ^a	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1512017	Florida	urine ^b	2015	<i>L. noguchii</i>	ND	NA	ND	C
IP1605021	Salto	urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Pyrogenes	ND	D
IP1611024	Artigas	urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Australis	ND	E
IP1611025	Paysandú****	urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	D
IP1703027	Durazno	urine ^a	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	NA	ND	F
IP1705032	Florida	urine	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	F
IP1708035	Rocha	kidney ^a	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	G
IP1709037	Cerro Largo	kidney ^a	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	H
IP1712055	Paysandú	urine	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	NA	ND	I

378

*, **, ***, ****, *****, *****: isolates obtained from animals in the same farm (indicated with equal number of asterisks)

379

^a: samples collected at abattoirs

380

^b: samples from calves with clinical signs of acute leptospirosis

381

^c: the number of repeats for the VNTR4, VNTR7 and VNTR10 alleles are reported for *L. interrogans*; whereas for *L. borgpetersenii*, they correspond to the VNTR10, VNTRLb4 and VNTRLb5 alleles

382

NA: no detectable agglutination against any of the 24 serogroup-specific antisera included in the reference panel

383

ND: not determined

384 The *Leptospira* species were determined by PCR amplification and partial sequencing of the
385 16S rRNA gene (*rrs*). Three different pathogenic species were thus identified (Table 1): *L.*
386 *interrogans* (n=21), *L. borgpetersenii* (n=10) and *L. noguchii* (n=9).

387 Serogrouping of isolates was performed by MAT with a collection of 24 rabbit antisera against
388 reference pathogenic serovars. All but one of the *L. interrogans* isolates corresponded to
389 serogroup Pomona, the different one belonging to serogroup Canicola. The *L. borgpetersenii*
390 strains all classed within serogroup Sejroe. In contrast, the *L. noguchii* isolates showed a
391 broader variety of serogroups, including Pyrogenes (n=1), Australis (n=1), Autumnalis (n=4),
392 and 3 *L. noguchii* isolates that did not agglutinate with any of the reference antisera used.

393 Taking into account the identification of species and serogroup, together with the VNTR
394 profiles (S1 Figure), it was possible to assign 20 *L. interrogans* strains to serovar Kennewicki,
395 1 *L. interrogans* to serovar Canicola, and the 10 *L. borgpetersenii* isolates to serovar Hardjo
396 (Table 1). The serovars of the *L. noguchii* isolates could not be predicted, given that current
397 VNTR profiling tables do not allow yet for serovar assignment of this species.

398 Twelve *L. interrogans*, five *L. borgpetersenii* and one *L. noguchii* strains, were isolated from
399 farms with no history of vaccination (Table 2). Among such animals, MAT agglutination titers
400 against reference strains were positive in ten cases (considering that national guidelines
401 currently define less than 200 as non-reactive). However, when local isolates were added to the
402 panel of MAT antigens for comparative purposes, 16 out of the 18 sera from non-vaccinated
403 herds showed anti-*Leptospira* titers against the homologous autochthonous strain that was
404 isolated (S5 Table). These results suggest that including local isolates of *Leptospira* spp. in the
405 panel of antigens used for MAT may improve the sensitivity of the method. All the isolates
406 recovered from herds with no history of vaccination, belonged to the homologous serogroup as
407 shown by the seroreactivity data (S5 Table).

408 **Table 2. MAT seroreactivity against reference *Leptospira* antigens and history of vaccination in cattle with positive culture of pathogenic**
 409 ***Leptospira* spp.**

Strain #	Species identification	Serogroup / presumptive Serovar identification	Seroreactivity of the animal from which the isolate was obtained (serogroup/titer)	Seroreactivity of other animals in the same herd* (serogroup)	History of vaccination in the farm	Antigens included in the vaccine
IP1507003	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 200		No	
IP1509008	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	nr	Pomona	No	
IP1509009	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 400		No	
IP1509010	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 400		No	
IP1512011	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	nr	Pomona	No	
IP1512014	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 400		No	
IP1512015	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 6400		Yes (19 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Pomona, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Canicola
IP1512016	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 800		Yes (19 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Pomona, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Canicola
IP1603018	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 3200		Yes (19 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Pomona, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Canicola
IP1609022	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 1600		Yes (19 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Pomona, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Canicola
IP1611026	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 6400 Sejroe Hardjobovis / 1600 Sejroe Hardjoprajitno / 1600 Sejroe Wolffii / 800		Yes (26 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Wolfii, Hardjo, Tarassovi and Grippotyphosa <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo
IP1710039	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 6400		No	

IP1710040	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 6400 Sejroe Hardjobovis / 3200 Sejroe Hardjoprjtitno / 1600 Sejroe Wolffii / 1600	No		
IP1710043	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 3200 Sejroe Hardjobovis / 800	No		
IP1710044	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 3200 Serjoe Hardjobovis / 3200 Serjoe Hardjoprjtitno / 800	No		
IP1710045	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	Pomona / 6400	No		
IP1710047	<i>L. interrogans</i>	Pomona Kennewicki	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjtitno Sejroe Wolffii	No	
IP1506001	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	Pomona / 400	No		
IP1509005	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjtitno Sejroe Wolffii Pomona	No	
IP1509006	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjtitno Sejroe Wolffii Pomona	No	
IP1512013	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjtitno Sejroe Wolffii Pomona	No	na
IP1605020	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	Sejroe Wolffii / 200	Y (120 dpv)	<i>L. interrogans</i> serovars Pomona, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Canicola	
IP1704030	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nr	Sejroe Hardjobovis, Sejroe Wolffii	Yes (nda)	nda

IP1704031	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nd	Sejroe Hardjobovis, Sejroe Wolffii	Yes (nda)	nda
IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe Hardjo	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjitno Sejroe Wolffii	No	
IP1512017	<i>L. noguchii</i>	No agglutination [§] / na [¶]	nr	nd	na	
IP1605021	<i>L. noguchii</i>	Pyrogenes	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjitno Sejroe Wolffii	No	
IP1611024	<i>L. noguchii</i>	Australis / na [¶]	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Hardjoprjitno Sejroe Wolffii Pomona	Yes (100 dpv)	<i>L.interrogans</i> serovars Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Wolfii, Hardjo, Tarassovi and Grippytyphosa <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo
IP1611025	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis / na [¶]	Sejroe Hardjobovis / 3200 Sejroe Hardjoprjitno / 3200 Sejroe Wolffii / 1600		Yes (26dpv)	<i>L.interrogans</i> serovars Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Wolfii, Hardjo, Tarassovi and Grippytyphosa <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo
IP1705032	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis / na [¶]	nr	Sejroe Hardjobovis Sejroe Wolffii Pomona	Yes (nda)	<i>L. interrogans</i> serovar Pomona
IP1712055	<i>L. noguchii</i>	No agglutination [§] / na [¶]	nr	Pomona	Yes (150dpv)	<i>L.interrogans</i> serovars Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Wolfii, Hardjo, Tarassovi and Grippytyphosa <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo

410

411

412

*Shown if the seroreactivity MAT titer <200 in the animal from which the isolate was recovered; § No agglutination against the reference panel of serogrouping antisera; ¶ No molecular proxy available for *L. noguchii* serovar assignment; **na**: not applicable; **nr**: non-reactive (below cutoff MAT titer 200); **nd**: not done; **nda**: no data available; **dpv**: days post vaccination when both urine and sera samples were collected

413 **Phylogeny of *Leptospira* isolates based on *secY* gene sequence analysis.** Genetic analysis of
414 the 501bp *secY* allele was performed on the 40 typed isolates described in this work.
415 Comparison to other *L. interrogans* (serovars Pomona and Canicola), *L. borgpetersenii* (serovar
416 Hardjo) and *L. noguchii* sequences, obtained from other geographical regions and available in
417 public databases, allowed to build a picture of related groups. Also included in this analysis
418 were *secY* sequences obtained from 4 *Leptospira* strains recently isolated from human
419 infections in Uruguay by one of the groups of our consortium [12, 13]. Such human isolates
420 correspond to *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii* species. The dendrogram of
421 partial *secY* sequence clustering, uncovered four phylogenetic clades that corresponded to
422 genomospecies identified by partial *rrs* gene sequencing: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L.*
423 *kirschneri* and *L. noguchii* (Fig 2). The same 4-clades scenario emerged by calculating
424 phylogeny with *rrs* gene sequences (S2 Fig.). Only one homogeneous cluster was observed for
425 the *L. interrogans secY* sequences, indicating that bovine isolates from Uruguay belonging to
426 this species have close homology with isolates from South America (mainly from Brazil and
427 Argentina) [31]. It is worth noting that two *L. interrogans* strains that had recently been isolated
428 from human leptospirosis cases in Uruguay affecting rural workers [12, 13] clustered in the
429 same *secY* clade together with the *L. interrogans* bovine isolates that we now describe.
430 Concerning the *L. borgpetersenii* bovine strains, they also clustered with *L. borgpetersenii*
431 serogroup Sejroe isolates from human and bovine sources in South America, Australia and
432 USA; however, they showed no homology with the uruguayan *L. borgpetersenii* human isolate,
433 which belongs to serogroup Ballum (F Schelotto, personal communication). Contrasting with
434 such homogeneous clustering of *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* strains, *secY* sequence
435 analysis of the *L. noguchii* isolates revealed a substantially broader diversity, with isolates
436 grouped in two distinct clusters. The first included two isolates, from Panama and Peru. The
437 second cluster, with slight heterogeneity within, comprised all the *L. noguchii* isolates we are
438 now reporting from Uruguay, as well as a number of other strains obtained from both human
439 and animal origin in several countries of the American continent (Brazil, Nicaragua, Peru,
440 Trinidad & Tobago, USA). Worth highlighting, the *secY* sequences of our bovine isolates
441 IP1611024, IP1708035 and IP1709037, are identical to some of the *L. noguchii* strains recently
442 reported in Brazil, isolated from cattle [32] and humans [33].

443

444 **Fig 2. Phylogeny of *Leptospira* spp. isolates based on *secY* gene sequence analysis.**
445 Dendrogram using the neighbor-joining method (calculated using the Tamura-Neil model)
446 plotting the relatedness of partial sequences of the *secY* gene including the 40 bovine isolates

447 from Uruguay that we are now reporting. Uruguayan strains from bovine hosts (in blue) and
448 human patients (green) are compared to 31 additional sequences (in red) corresponding to
449 isolates obtained elsewhere and from a variety of hosts, as indicated within parentheses. Isolates
450 obtained in Uruguay are named according to their strain denomination as "IP" (Institut Pasteur
451 Montevideo) or "IH" (Instituto de Higiene) followed by a 7- or 4-digit number, and after the
452 vertical bar the GenBank accession number is reported for each one (S2 Table). Asterisks
453 indicate the known serovar for isolates where such information is known, following the code:
454 *serovar Pomona **serovar Panama ***serovar Autumnalis ****serovar Hardjo. Well
455 separated phylogenetic clades correspond to different *Leptospira* species as indicated toward
456 the right of the figure. The Patoc strain at the bottom of the panel belongs to the saprophytic
457 species *L. biflexa*, and is included as a phylogenetic distance reference.

458

459 **Discussion**

460 We are now reporting the isolation and typing of 40 native strains of pathogenic *Leptospira*
461 spp. from infected cattle in Uruguay. This is the first systematic effort to isolate and type
462 autochthonous *Leptospira* strains from cattle in this country, where bovine leptospirosis is a
463 major concern as a cause of abortions and zoonotic dissemination. *L. interrogans* serovar
464 Kennewicki (serogroup Pomona), our most frequent bovine isolate, has actually been also
465 recovered from human patients with leptospirosis in Uruguay [12]. To further confirm this
466 potential link between cattle and humans, we have now shown that the *secY* genotypes of both
467 *L. interrogans* Kennewicki and Canicola serovars, are identical in *Leptospira* strains isolated
468 from patients (rural workers) and from cattle (Fig. 2), strongly suggesting that the latter
469 disseminate the infection to exposed humans.

470 The successful culture of leptospires from bovine samples has likely been boosted by
471 optimizing field sampling protocols, especially after quantifying time-dependent *Leptospira*
472 viability in bovine urine. PCR screening has also been instrumental in prioritizing cultures, the
473 number of which increased dramatically due to the systematic use of three culture dilutions per
474 animal, themselves important to improve purity in some cases.

475 A total of 963 urine samples that were processed, eventually produced 42 positive cultures.
476 Among these 42, 9 had produced negative PCR results at the time of urine sample screening.
477 Two different scenarios explain such discrepancies: 8 of the 9 negative results, appeared early
478 during our studies, and eventually proved to be the consequence of urine inhibition, triggering
479 the optimization of our protocols (see Methods and Fig 1). Only in one sample we can strongly
480 suggest that it is the PCR method's sensitivity that explains the divergent result. In sum, *lipL32*

481 PCR screening is an instrumental strategy to prioritize culture follow-ups, albeit not leading to
482 discarding ongoing cultures. We are now optimizing a more sensitive real-time PCR approach,
483 anticipated to also being more robust for screening purposes.

484 Regarding important, and frequently neglected factors that can lead to success or failure in
485 nation-wide efforts based on field sampling, it is worth highlighting the voluntary participation
486 of farmers and private veterinarians. Early arrangements ensuring for such implications were
487 critical logistic factors for a swift sample collection strategy and for gathering useful
488 information about herds and individual animals. Serial dilutions of the biologic samples on
489 separate culture tubes were successfully used as a means to tackle contamination issues. Most
490 of the positive cultures were successfully purified using the first two dilutions A and B, roughly
491 50% success from each one. Further diluting the inocula (tube C) allowed the
492 recovery/purification of only 4 additional isolates. Overall, EMJH media outperformed Fletcher
493 in our hands, with only two isolates grown from the latter that were also obtained with EMJH.

494 Combined serologic and molecular approaches revealed the presence of three different
495 *Leptospira* species. Besides the anticipated *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* species, known
496 to be major infectious agents in cattle [2, 34], an important number of isolates corresponded to
497 *L. noguchii*, both from field samples as well as from abattoirs. *L. noguchii* has been isolated
498 from cattle in South America [14, 32, 33], but had never been reported in Uruguay, and
499 extremely limited information is currently available about its epidemiologic importance. Are *L.*
500 *noguchii* strains a relevant cause of acute disease or reproductive problems in cattle? One of the
501 two strains that we have isolated from calves with signs of acute leptospirosis, was actually
502 identified as *L. noguchii*, but more information is urgently needed in order to establish the
503 contribution of this unanticipated species in the burden of veterinarian and human leptospirosis
504 in South America. The other strain infecting a suspected acute case was confirmed as *L.*
505 *interrogans* serogroup Canicola serovar Canicola, a highly virulent variant often isolated from
506 dogs. Serovar Canicola is however not considered to be adapted to cattle, although it has been
507 reported to infect bovine hosts incidentally, including recent reports in Brazil [35]. It is
508 interesting to note that the isolates belonging to *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*, displayed
509 limited variation. The latter revealed a single VNTR profile (consistent with a single serovar,
510 Hardjo, within the Sejroe serogroup), also coherent with a unique *secY* genotype (B). As for the
511 *L. interrogans* strains, once again quite homogeneous features were found for all isolates, with
512 20 out of 21 compatible with serovar Kennewicki (serogroup Pomona), and displaying a single
513 *secY* genotype (A). Only one *L. interrogans* was different, VNTR clearly matching the one
514 expected for serovar Canicola (in line with Canicola serogroup sero-agglutination), yet sharing

515 the same *secY* genotype A as the Pomona Kennewicki strains. In stark contrast, the 9 *L. noguchii*
516 isolates uncovered an unexpected variety of serogroups. We have not yet assigned serovar types
517 to these *L. noguchii* strains, given that the VNTR multilocus analysis scheme has not been
518 validated for this *Leptospira* species on the basis of cross-agglutinin absorption tests (CAAT)
519 with serovar-specific antisera. We are currently sequencing the whole genomes for all isolates
520 and actively pursuing direct serovar identification by CAAT for the *L. noguchii* strains.
521 However, it can immediately be recognized that all nine *L. noguchii* strains likely correspond
522 to 9 distinct serovars, combining the information of serogrouping and *secY* genotypes. Three of
523 them did not agglutinate with any of the reference antisera tested, which span 24 serogroups
524 that cover major pathogenic *Leptospira* [36]. The other six corresponded to serogroups
525 Pyrogenes, Australis and Autumnalis, the latter including four different isolates, all of which
526 differed in *secY* genotypes (D, F, G and H). The three *L. noguchii* isolates that did not react
527 with serogroup-specific reference antisera, revealed as yet three additional *secY* genotypes (C,
528 F and I), hence likely pertaining to three disparate serovars as well.

529 Serogroup Pomona is one of the most common variants isolated from animals worldwide [37].
530 This serogroup displays important genetic diversity, as revealed by restriction endonuclease
531 analysis (REA) [38], even within serovars. However, the REA-based genetic profiles of
532 Pomona serovar Kennewicki, show high stability among isolates from a single outbreak [39]
533 and, interestingly, a strong correlation between specific hosts and corresponding REA profile.
534 Those results are consistent with our study: analyzed by *secY* allele genotyping, a high
535 homogeneity was observed in all Pomona Kennewicki isolates from cattle, despite the broad
536 geographic distribution of the isolates, including those obtained in the field and from
537 slaughterhouses. Serovar Kennewicki is recognized as an animal pathogen [40], apparently
538 adapted to pigs as maintenance host. Even though in Uruguay domestic pigs are not usually
539 raised together with cattle, a forbidden practice in dairy farms, we should not rule out wild boars
540 or other wild animals as potential hosts for this serovar, nor an endemic cycle in domestic cattle
541 [2].

542 More information is needed to evaluate the prevalence of the serovars we have isolated in the
543 whole country, and neighboring ones in South America. Furthermore, the virulence of these
544 strains in relevant leptospirosis models will be important evidence that must be investigated,
545 regarding pathogenicity (e.g. mortality in the hamster model) and renal colonization (e.g. in the
546 bovine host). It is worth highlighting that we have isolated similar *Leptospira* species and sero-
547 variants from chronic and acute cases in the field, as well as from dead animals from abattoirs,
548 suggesting they represent a genuine sampling of the true population distribution of infectious

549 *Leptospira* spp. in cattle. To be conclusive, an epidemiologic study with national geographic
550 coverage is a necessary next step, as well as an in-depth molecular analysis of the *Leptospira*
551 DNA recovered from PCR-positive urine samples that did not result in positive cultures.

552 At the individual animal level, and only considering herds with no recent history of vaccination
553 (18 cases), the MAT technique correctly predicted the serogroup (Pomona) of 9 out of the 12
554 animals where *L. interrogans* strains were isolated (Table 2). In contrast, none of the 5 cases
555 with *L. borgpetersenii* infections, nor the one from which a *L. noguchii* strain was isolated,
556 presented detectable antibody titers using the diagnostic panel of reference available at the
557 national diagnostics laboratory (DILAVE, MGAP). This is likely due to low sensitivity of the
558 MAT, a known issue when it comes to host-acclimated serovars such as Hardjo in cattle [41].
559 The MAT did not identify any of the *L. noguchii* isolates, as these were not included within the
560 reference antigen panel in the national diagnostics laboratories (DILAVE, Ministry of
561 Livestock, Agriculture and Fishery). This finding is important, as *L. noguchii* is a recognized
562 pathogenic species for animals and humans [33, 42]. However, when autochthonous *L.*
563 *interrogans* serogroup Pomona, *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe and representative
564 serogroups of the *L. noguchii* strains were included for anti-*Leptospira* antibodies titration by
565 MAT, we did observe an increase of sensitivity: analyzing those herds with no history of recent
566 vaccination, all the animals from which *L. borgpetersenii* strains were isolated showed
567 reactivity against the local isolate, as it was also the case for an animal from which *L. noguchii*
568 serogroup Pyrogenes was isolated (S5 Table).

569 As a consequence of this study, the inclusion of these native strains among the antigens for
570 MAT diagnostics and seroprevalence epidemiologic studies, must be an immediate action. Such
571 policies will be important to increase MAT-based diagnostics sensitivity and accuracy [43], and
572 to improve the estimations of prevalence and incidence of bovine leptospirosis infection in the
573 country. Furthermore, isolation and characterization of circulating *Leptospira* strains, are
574 ongoing activities as a result of our multicentric consortium efforts. We anticipate that new
575 variants and/or species may be discovered, achieving a more complete understanding of current
576 diversity of *Leptospira* in South America.

577 A recent study of bovine *Leptospira* spp. isolates obtained from animals in slaughterhouses in
578 Brazil, shows an important diversity in terms of species and serovars [14]. Libonati *et al.* report
579 two *L. interrogans* strains belonging to serogroup Sejroe, and four different serogroups
580 assigned to each of the other two *L. santarosai* and *L. noguchii* species identified. Our results
581 now demonstrate a similar diversity of bovine isolates in terms of species and serovars. We
582 have isolated *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe strains, although so far, no *L. santarosai*

583 isolates nor *L. interrogans* serogroup Sejroe have been recovered. Instead, we did isolate several
584 strains of *L. interrogans* serogroup Pomona (presumptive serovar Kennewicki) and one
585 Canicola (presumptive serovar Canicola). With regards to *L. noguchii*, the broad range of
586 serogroups that we have detected seems to be a shared scenario with the situation in Brazil,
587 with Autumnalis, Australis and Pyrogenes identified in both countries (additionally, serogroup
588 Panama has also been identified in Brazil [32]). However, three *L. noguchii* isolates could not
589 be classified in any serogroup, failing to agglutinate with the broad panel of reference antisera
590 that was used. These results were confirmed in three different laboratories within our
591 consortium, including the Paris center (WHO Collaborating Center and French reference
592 laboratory for leptospirosis). In any case, these novel serogroups are distinct from the *L.*
593 *noguchii* strains so far isolated in Brazil.

594 It does not escape our attention that most of the serovars that we are now reporting, are not
595 included in the vaccines currently available to the farmers. Except for *L. borgpetersenii* serovar
596 Hardjo and *L. interrogans* serovar Canicola, to the best of our knowledge neither serovar
597 Kennewicki (*L. interrogans*) nor any of the *L. noguchii* serogroups/serovars that we identified,
598 are being included in bacterin formulations that different companies produce and
599 commercialize as bovine vaccines in South America (Table 2). Bacterins confer little or no
600 cross-protection between serovars, hence the serovars that actually circulate in each region
601 should be included to aim for efficacious vaccines [34]. Indeed, in our study we have obtained
602 several isolates from one herd before and after vaccination. We will now perform closer
603 analyses of naturally exposed herds, following up the effects of vaccination at the individual
604 level. That current vaccines might have shifted the serovar profile of currently circulating
605 *Leptospira* strains in Uruguay, is a plausible scenario. Proper bacterin vaccination should result
606 in herd protection. We should have thus observed lower isolation rates from vaccinated herds,
607 but we have not. Urine shedding of leptospires can be effectively controlled or significantly
608 reduced in livestock, by using the correct bacterin formulations, according to recent studies
609 with naturally exposed sheep herds [44] or with experimental vaccination/challenge approaches
610 in cattle [45]. Significant reduction in bovine renal colonization and bacterial urinary shedding
611 are achieved by vaccination with bacterins that include the infectious serovars [46], ultimately
612 controlling endemic cycles of infection. Moreover, a systematic vaccination and surveillance
613 program for pig and cattle leptospirosis in New Zealand, demonstrated a correlative dramatic
614 decrease in the incidence, not only of the animal disease, but also of human leptospirosis [47].
615 Nevertheless, further research is needed to obtain long-lasting vaccination effects and complete
616 protection against bacterial infection. Likely a protective cellular immune response is needed

617 in the cattle model [46, 48, 49] to generate a highly efficacious vaccine against leptospirosis,
618 and not only the humoral response triggered by killed-cell bacterins. The latter are also known
619 to trigger a biased response towards the serovar-specific bacterial lipopolysaccharide antigen,
620 T-independent with lack of memory response [50].

621 A more thorough understanding of leptospirosis epidemiology, including maintenance hosts
622 and impact in livestock production, is essential to understand and design effective control
623 strategies for this zoonosis. Efficacy studies with currently available vaccines for bovine
624 leptospirosis in our region is also urgently needed. The assembly of this multicentric consortium
625 gathering the complementary expertise of several key research and governmental institutions
626 in Uruguay, has made possible to obtain the first repository of *Leptospira* isolates in the public
627 domain, most of them already typed in terms of species, serogroup and serovar. This is a major
628 milestone in the way of controlling leptospirosis in Uruguay, with the associated far-reaching
629 aim of reducing the risk for the human population.

630

631 **Acknowledgments**

632 We thank Julie Collins Emerson and Peter Wilson (Massey University, Palmerston North, New
633 Zealand); Walter Lilenbaum and Ana Paula Loureiro (Universidade Federal Fluminense, Rio
634 de Janeiro, Brazil); and Pascale Bourhy (Institut Pasteur, France), for their helpful suggestions
635 and lively discussions. We also thank Dr. Jorge Mattos (MGAP, Uruguay) for key assistance
636 in obtaining samples at slaughterhouses.

637

638

639 **Supporting information Captions**

640

641 **S1 Table. Reference *Leptospira* strains used as antigens for antibody titration of bovine**
642 **sera, by microscopic agglutination test.**

643

644 **S2 Table. GenBank accession numbers for *secY* and *rrs* partial sequences obtained for all**
645 **the *Leptospira* spp. isolates included in this work.**

646

647 **S3 Table. Reference antisera used for serogroup determination by microscopic**
648 **agglutination test.**

649

650 **S4 Table. Effect of bovine urine in *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cell viability.**

651

652 **S5 Table. MAT of sera from individual animals from which pathogenic *Leptospira* strains**
653 **were isolated, circumscribed to farms with no history of vaccination (see Table 2).**
654 **Autochthonous *Leptospira* antigens are compared against the reference panel used by the**
655 **national health agency.**

656

657 **S1 Figure. Representative VNTR profiles for *L. interrogans* and *L. borgpetersenii***
658 **autochthonous isolates.** PCR amplification profile of VNTR loci 4, 7, 10, Lb4 and Lb5
659 corresponding to *L. interrogans* serogroup Pomona isolates IP1512014 and IP1512016 (lines 1
660 and 2, respectively); *L. interrogans* serogroup Canicola isolate IP1710049 (line 3) and *L.*
661 *borgpetersenii* serogroup Sejroe isolates IP1506001, IP170430 and IP1708034 (lines 4, 5, 6,
662 respectively). (-): negative control

663

664 **S2 Figure. Phylogeny of *Leptospira* spp. isolates based on *rrs* sequence analysis.** Partial
665 sequences of the *rrs* gene corresponding to 40 bovine (names in blue) and 4 human (names in
666 green) isolates from Uruguay are plotted in comparison to 4 sequences corresponding to
667 reference strains obtained elsewhere (names in red) and from different hosts, as indicated within
668 parentheses. GenBank accession numbers for each sequence are indicated (see S2 Table for a
669 complete table of sequence accession numbers corresponding to the isolates obtained in this
670 work).

671

672 **References**

673

- 674 1. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat
675 Rev Microbiol. 2017;15(5):297-307.
- 676 2. Ellis WA. Animal leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;387:99-137.
- 677 3. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol.
678 2015;387:65-97.
- 679 4. Benschop J, Collins-Emerson J, Maskill A, O'Connor P, Tunbridge M, Yupiana Y, et
680 al. Leptospirosis in three workers on a dairy farm with unvaccinated cattle. N Z Med J.
681 2017;130(1462):102-108.
- 682 5. Adler B. History of leptospirosis and leptospira. Curr Top Microbiol Immunol.
683 2015;387:1-9.
- 684 6. Millan J, Cevidanes A, Chirife AD, Candela MG, Leon-Vizcaino L. Risk factors of
685 *Leptospira* infection in Mediterranean periurban micromammals. Zoonoses Public Health.
686 2018;65(1):e79-e85.

- 687 7. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al.
688 Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. PLoS Negl Trop Dis.
689 2015;9(9):e0003898. Epub 2015/09/18.
- 690 8. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al.
691 Global burden of leptospirosis: estimated in terms of Disability Adjusted Life Years. PLoS Negl
692 Trop Dis. 2015;9(10):e0004122. Epub 2015/10/03.
- 693 9. Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. Avances en leptospirosis en el Uruguay.
694 Rev Urug Pat Clín Microbiol. 1971;9:186-194.
- 695 10. Repiso MV, Gil A, Bañales PM, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, et al. Prevalencia
696 de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la
697 ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. Veterinaria
698 (Montevideo). 2005;40(157):5-28.
- 699 11. Schelotto F, Hernandez E, Gonzalez S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, et al. A ten-year
700 follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. Rev Inst Med
701 Trop Sao Paulo. 2012;54(2):69-75.
- 702 12. Meny P, Menendez C, Quintero J, Hernandez E, Rios C, Balassiano IT, et al.
703 Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. Rev Inst
704 Med Trop Sao Paulo. 2017;59:e79.
- 705 13. Meny P, Menendez C, Ashfield N, Rios C, Iglesias T, Quintero J, et al. Leptospirosis in
706 human groups at risk in Uruguay. In: Society International Leptospirosis, editor. 10th
707 International Leptospirosis Society Conference 2017 "Science for People"; Palmerston North,
708 New Zealand 2017. p. 181.
- 709 14. Libonati H, Pinto PS, Lilenbaum W. Seronegativity of bovines face to their own
710 recovered leptospiral isolates. Microb Pathog. 2017;108:101-103.
- 711 15. Chideroli RT, Pereira UP, Goncalves DD, Nakamura AY, Alfieri AA, Alfieri AF, et al.
712 Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain
713 Hardjovovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. Genet Mol Res. 2016;15(1).
- 714 16. Cosate MRV, Sakamoto T, de Oliveira Mendes TA, Moreira EC, Regis da Silva CG,
715 Brasil B, et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from
716 leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. BMC Vet Res. 2017;13(1):177.
- 717 17. Salgado M, Otto B, Moroni M, Sandoval E, Reinhardt G, Boqvist S, et al. Isolation of
718 *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile.
719 BMC Vet Res. 2015;11:66.
- 720 18. Myers DM, Jelambi F. Isolation and identification of *Leptospira* Hardjo from cattle in
721 Argentina. Trop Geogr Med. 1975;27(1):63-70. Epub 1975/03/01.
- 722 19. Director A, Penna B, Hamond C, Loureiro AP, Martins G, Medeiros MA, et al. Isolation
723 of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests
724 potential for venereal transmission. J Med Microbiol. 2014;63(Pt 9):1234-1236.
- 725 20. Carmona-Gasca CA, León Lara L, Castillo-Sánchez LO, Ramírez-Ortega JM, Ko A,
726 Luna Palomera C, et al. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new
727 isolates with potential impact in bovine production and public health. Vet Mex.
728 2011;42(4):277-288.
- 729 21. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne:
730 MediSci; 1999. 272 p.
- 731 22. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What
732 makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*.
733 PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004403. Epub 2016/02/20.
- 734 23. Galloway RL, Hoffmaster AR. Optimization of LipL32 PCR assay for increased
735 sensitivity in diagnosing leptospirosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;82(3):199-200.

- 736 24. Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Pestana C, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, et
737 al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in
738 livestock. *Vet Res Commun*. 2014;38(1):81-85.
- 739 25. Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al.
740 Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of
741 pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:28. Epub 2006/11/24.
- 742 26. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain
743 reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219-
744 2224.
- 745 27. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus
746 variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J*
747 *Clin Microbiol*. 2006;44(11):3954-3962.
- 748 28. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al.
749 Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species.
750 *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):e1374.
- 751 29. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the
752 population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:595.
- 753 30. Chideroli RT, Goncalves DD, Suphoronski SA, Alfieri AF, Alfieri AA, de Oliveira AG,
754 et al. Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular
755 differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. *Front Microbiol*. 2017;8:2155.
- 756 31. Hamond C, Pestana CP, Medeiros MA, Lilenbaum W. Genotyping of *Leptospira*
757 directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil.
758 *Epidemiol Infect*. 2016;144(1):72-75.
- 759 32. Martins G, Loureiro AP, Hamond C, Pinna MH, Bremont S, Bourhy P, et al. First
760 isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol*
761 *Infect*. 2015;143(7):1538-1541.
- 762 33. Silva ÉF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanzio DA, et al.
763 *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis*.
764 2009;15(4):621-623.
- 765 34. Adler B, Moctezuma AD. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-
766 4):287-296.
- 767 35. Miraglia F, de Moraes ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Zacarias FG, et al.
768 Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated
769 from dogs, swine, and bovine in Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2013;45(1):117-121. Epub
770 2012/05/23.
- 771 36. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326.
- 772 37. Arent ZJ, Gilmore C, San-Miguel Ayanz JM, Neyra LQ, Garcia-Pena FJ. Molecular
773 epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in
774 Spain. *Ecohealth*. 2017;14(1):48-57.
- 775 38. Hathaway SC, Marshall RB, Little TW, Headlam SA, Winter PJ. Differentiation of
776 reference strains of leptospires of the Pomona serogroup by cross-agglutination absorption and
777 restriction endonuclease analysis. *Res Vet Sci*. 1985;39(2):145-150.
- 778 39. Bolin CA, Zuerner RL. Correlation between DNA restriction fragment length
779 polymorphisms in *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki and host animal
780 source. *J Clin Microbiol*. 1996;34(2):424-425.
- 781 40. Ellis WA. Leptospirosis. In: Zimmerman J. J., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson
782 G. W., editors. *Diseases of Swine*. 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012. p. 770–778.
- 783 41. Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: Ellis W.A., Little T.W.A.,
784 editors. *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*. Dordrecht, The Netherlands:
785 Martinus Nijhoff Publishers; 1986. p. 13–24.

- 786 42. Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, et al.
787 Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*.
788 2008;26(31):3892-3896.
- 789 43. Pinto PS, Loureiro AP, Penna B, Lilenbaum W. Usage of *Leptospira* spp. local strains
790 as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trop*.
791 2015;149:163-167.
- 792 44. Vallee E, Ridler AL, Heuer C, Collins-Emerson JM, Benschop J, Wilson PR.
793 Effectiveness of a commercial leptospiral vaccine on urinary shedding in naturally exposed
794 sheep in New Zealand. *Vaccine*. 2017;35(9):1362-1368.
- 795 45. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization
796 and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet*
797 *Res*. 2001;62(7):995-1000.
- 798 46. Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii*
799 serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal
800 colonization. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(4):684-691.
- 801 47. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. Changing epidemiology of human
802 leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect*. 2002;128(1):29-36.
- 803 48. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira*
804 *borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and
805 gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun*. 2001;69(12):7550-7558. Epub 2001/11/14.
- 806 49. Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, et al. Evaluation of
807 type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira*
808 *borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect*
809 *Immun*. 2002;70(11):6147-6157. Epub 2002/10/16.
- 810 50. Adler B. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:251-
811 272.
- 812

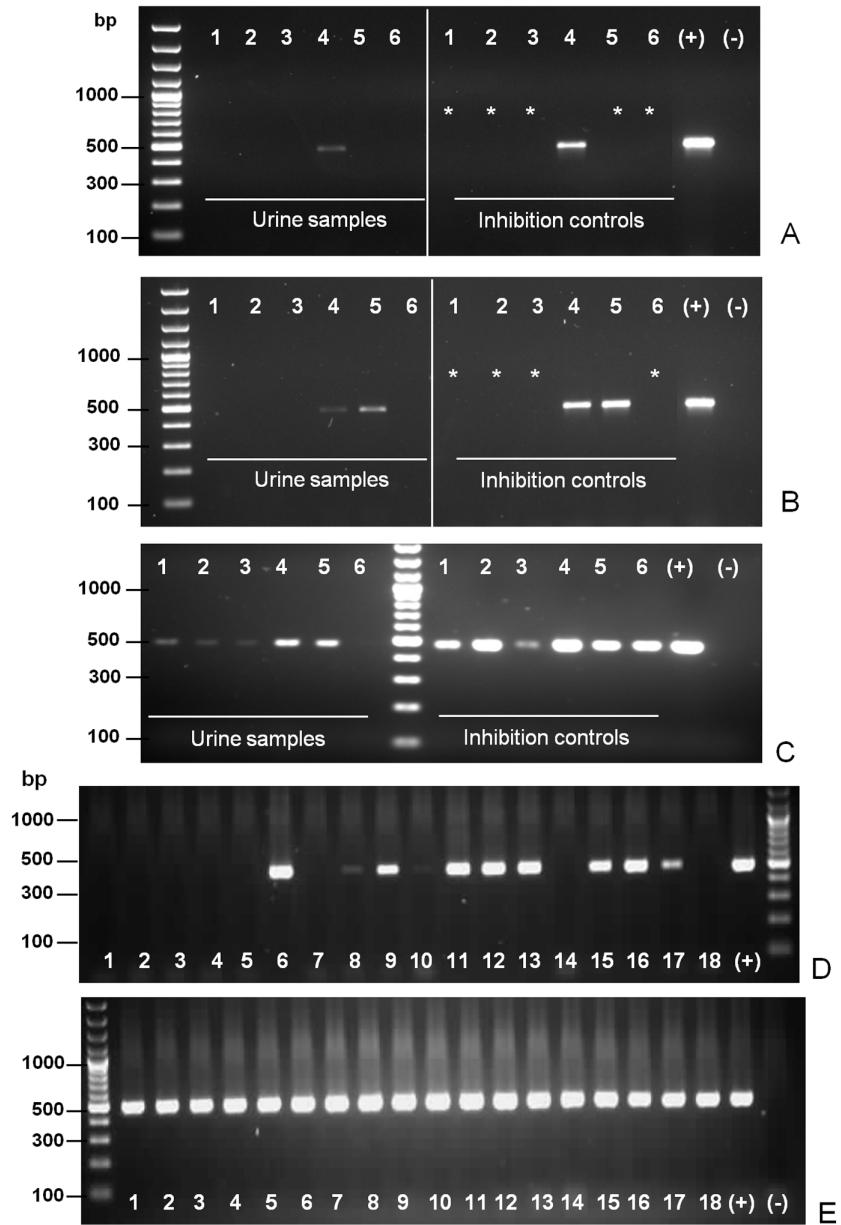


Figure 1

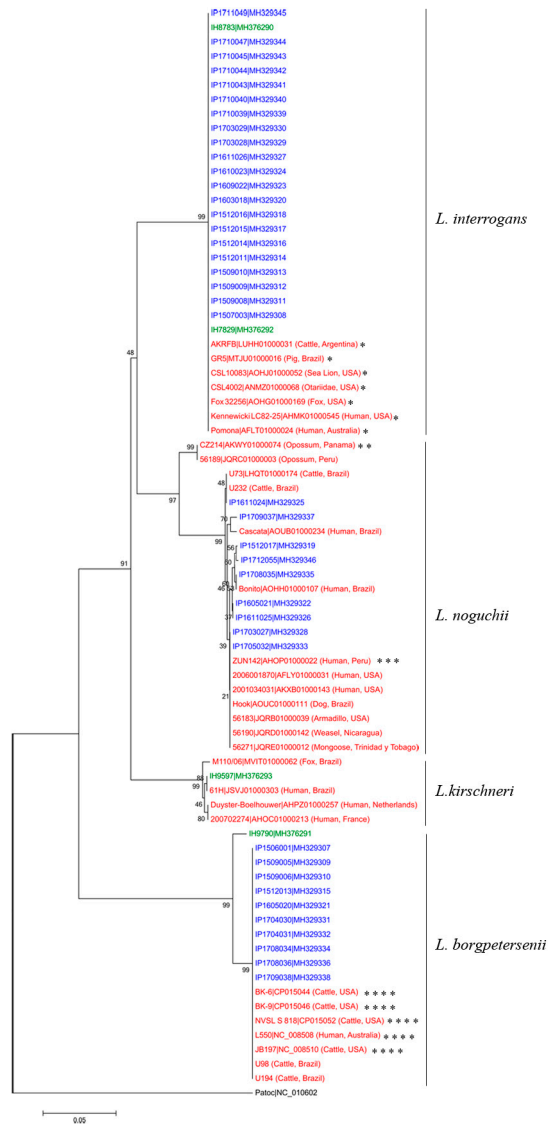


Figure 2

Supporting Information

S1 Table. Reference *Leptospira* strains used as antigens for antibody titration of bovine sera, by microscopic agglutination test. This panel is defined by the Uruguayan veterinarian health authorities (Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery), and used for diagnostic purposes.

Serogroup	Strain	Serovar
Pomona	Pomona	Pomona
Sejroe	Hardjo-Bovis	Hardjo
Sejroe	Hardjo-Prajitno	Hardjo
Sejroe	3705	Wolfii
Icterohaemorrhagiae	Ictero I	Icterohaemorrhagiae
Grippotyphosa	Moskva V	Grippotyphosa
Canicola	Hond Utrecht	Canicola

S2 Table. GenBank accession numbers for *secY* and *rrs* partial sequences obtained for all the *Leptospira* spp. isolates included in this work

<i>secY</i> sequence ID	GenBank Accession number	<i>rrs</i> sequence ID	GenBank Accession number
IP1506001	MH325388	IP1506001	MH329307
IP1507003	MH325389	IP1507003	MH329308
IP1509005	MH325390	IP1509005	MH329309
IP1509006	MH325391	IP1509006	MH329310
IP1509008	MH325392	IP1509008	MH329311
IP1509009	MH325393	IP1509009	MH329312
IP1509010	MH325394	IP1509010	MH329313
IP1512011	MH325395	IP1512011	MH329314
IP1512013	MH325396	IP1512013	MH329315
IP1512014	MH325397	IP1512014	MH329316
IP1512015	MH325398	IP1512015	MH329317
IP1512016	MH325399	IP1512016	MH329318
IP1512017	MH325400	IP1512017	MH329319
IP1603018	MH325401	IP1603018	MH329320
IP1605020	MH325402	IP1605020	MH329321
IP1605021	MH325403	IP1605021	MH329322
IP1609022	MH325404	IP1609022	MH329323
IP1610023	MH325405	IP1610023	MH329324
IP1611024	MH325406	IP1611024	MH329325
IP1611025	MH325407	IP1611025	MH329326
IP1611026	MH325408	IP1611026	MH329327
IP1703027	MH325409	IP1703027	MH329328
IP1703028	MH325410	IP1703028	MH329329
IP1703029	MH325411	IP1703029	MH329330
IP1704030	MH325412	IP1704030	MH329331
IP1704031	MH325413	IP1704031	MH329332
IP1705032	MH325414	IP1705032	MH329333
IP1708034	MH325415	IP1708034	MH329334
IP1708035	MH325416	IP1708035	MH329335
IP1708036	MH325417	IP1708036	MH329336
IP1709037	MH325418	IP1709037	MH329337
IP1709038	MH325419	IP1709038	MH329338
IP1710039	MH325420	IP1710039	MH329339
IP1710040	MH325421	IP1710040	MH329340
IP1710043	MH325422	IP1710043	MH329341
IP1710044	MH325423	IP1710044	MH329342
IP1710045	MH325424	IP1710045	MH329343
IP1710047	MH325425	IP1710047	MH329344
IP1711049	MH325426	IP1711049	MH329345
IP1712055	MH325427	IP1712055	MH329346
IH8783	MH376290	IH8783	MH374851
IH9790	MH376291	IH9790	MH374852
IH7829	MH376292	IH7829	MH374853
IH9597	MH376293	IH9597	MH374854

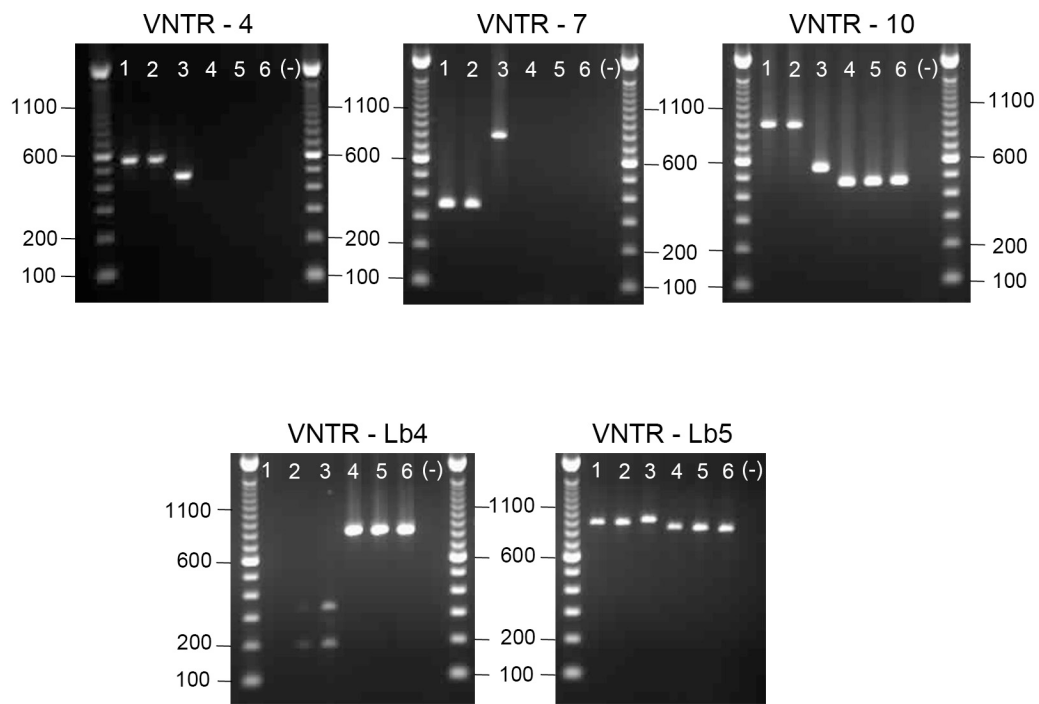
S3 Table. Reference antisera used for serogroup determination by microscopic agglutination test.

Antiserum #	Serogroup	Serovar	Strain
1	Australis	Australis	Ballico
2	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	Bataviae	Argentinensis	Peludo
4	Canicola	Portlandvere	MY 1039
5	Ballum	Castellonis	Castellon 3
6	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	Grippotyphosa	Grippotyphosa type Moskva	Moskva V
8	Sejroe	Hardjo type Bovis	Sponselee
9	Hebdomadis	Goiano	Bovino 131
10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
11	Panama	Panama	CZ 214
12	Semaranga	Patoc	Patoc I
13	Pomona	Proechimys	1161 U
14	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	Sejroe	Sejroe	M 84
16	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
17	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
18	Celledoni	Celledoni	Celledoni
19	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	Mini	Mini	Sari
21	Sarmin	Rio	Rr 5
22	Shermani	Shermani	1342 K
23	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
24	Louisiana	Louisiana	LSU 1945

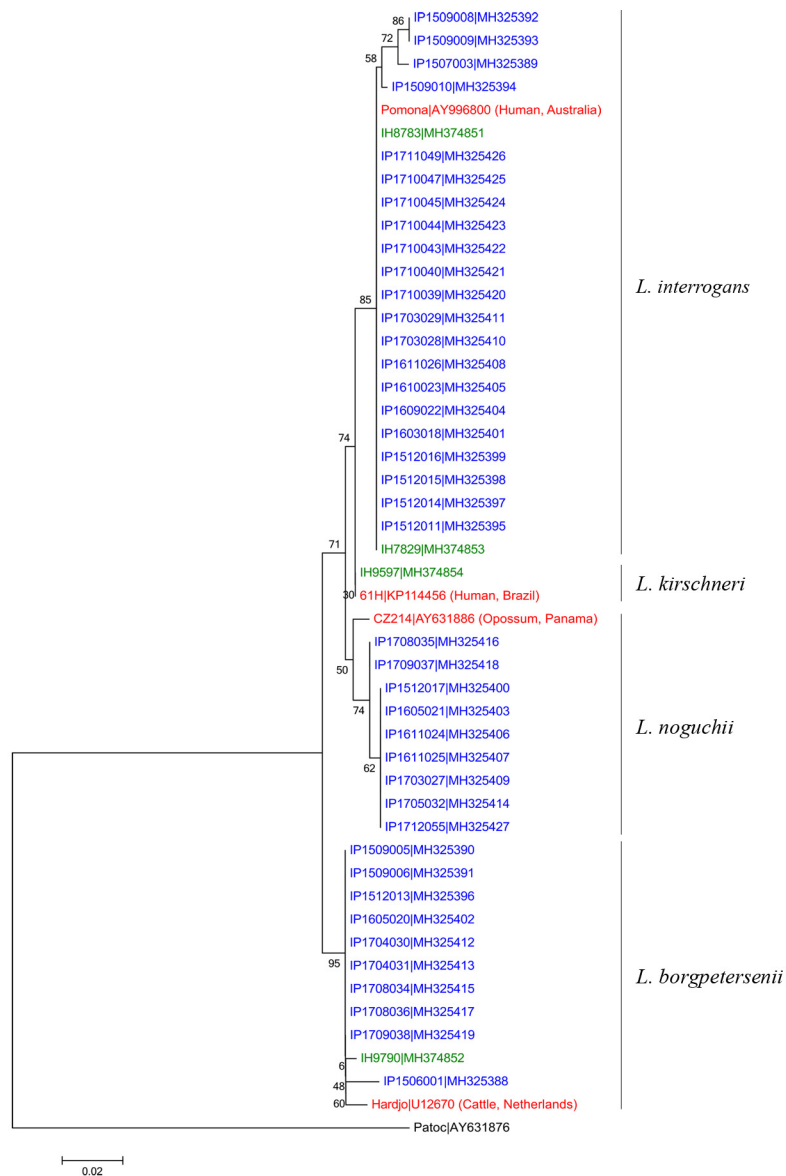
S5 Table. MAT of sera from individual animals from which pathogenic *Leptospira* strains were isolated, circumscribed to farms with no history of vaccination (see Table 2). Autochthonous *Leptospira* antigens are compared against the reference panel used by the national health agency.

Strain #	Strain identification (serogroup and presumptive serovar)	Seroreactivity against reference strains (serogroup/titer)	Seroreactivity against autochthonous strains* (serogroup /titer)
IP1507003	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 200	Pomona / 6400
IP1509008	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	nr	Pomona / 200
IP1509009	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 1600
IP1509010	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 6400
IP1512011	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	nr	Pomona / 100
IP1512014	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 3200
IP1710039	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400	Pomona / 6400
IP1710040	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400 Sejroe Hardjobovis / 3200 Sejroe Hardjoprajitno / 1600 Sejroe Wolffii / 1600	Pomona / 6400
IP1710043	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 3200 Sejroe Hardjobovis / 800	Pomona / 1600
IP1710044	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 3200 Sejroe Hardjobovis / 3200 Sejroe Hardjoprajitno / 800	Pomona / 3200
IP1710045	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400	Pomona / 6400
IP1710047	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	nr	Pomona / 100
IP1506001	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Pomona / 400	Sejroe / 200
IP1509005	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	nr	Sejroe / 400
IP1509006	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	nr	Sejroe / 800
IP1512013	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	nr	Sejroe / 400
IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	nr	Sejroe / 400
IP1605021	<i>L. noguchii</i> (Pyrogenes)	nr	Pyrogenes / 100

* The panel of autochthonous strains used as antigens included representative local isolates belonging to homologous serogroups Pomona, Sejroe and Pyrogenes; **nr**: non-reactive (below cutoff titer ≥ 100)



S1 Figure. Variable number of tandem repeat (VNTR) profiling. PCR amplifications of VNTR loci 4, 7, 10, Lb4 and Lb5, separated by agarose electrophoresis and ethidium bromide staining. Representative gels are included corresponding to: *L. interrogans* serogroup Pomona isolates IP1512014 and IP1512016 (lines 1 and 2, respectively); *L. interrogans* serogroup Canicola isolate IP1710049 (line 3) and *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe isolates IP1506001, IP170430 and IP1708034 (lines 4, 5, 6, respectively). A PCR negative control is included in each gel, lanes labeled as (-). Molecular weight marker 100bp-ladders are included on side lanes, with a few reference sizes labeled in number of base pairs.



S2 Figure. Phylogeny of *Leptospira* spp. isolates based on *rrs* sequence analysis. Dendrogram using the neighbor-joining method (calculated using the Tamura-Neil model) plotting the relatedness of partial sequences of the 16S rRNA gene (*rrs*) including the 40 bovine isolates from Uruguay (blue labels) that we are now reporting. Sequences from 4 human isolates from Uruguay (green labels) were also included and plotted in comparison to 4 sequences corresponding to reference strains obtained elsewhere (red labels) and from different hosts, as indicated within parentheses. Isolates obtained in Uruguay are named according to their strain denomination as "IP" (Institut Pasteur Montevideo) or "IH" (Instituto de Higiene) followed by a 7- or 4-digit number, and after the vertical bar the GenBank accession number is reported for each one (S2 Table). Well separated phylogenetic clades correspond to different *Leptospira* species as indicated toward the right of the figure. The Patoc strain at the bottom of the panel belongs to the saprophytic species *L. biflexa*, and is included as a phylogenetic distance reference.

Members of the “Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis” Consortium :

1- Plataforma Nacional de Investigacion en Salud Animal - Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)

Maria Laura Casaux
Martín Fraga
Federico Giannitti
Melissa Macías-Rioseco
Cecilia Monesiglio
Yisell Perdomo
Franklin Riet-Correa
Caroline da Silva Silveira

2- División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP)

Gimena Avila
Natasha Barrandeguy
Carolina Briano
Florencia Buroni
Fernando Dutra
Maria Cristina Easton
Valentina Macchi
Alvaro Núñez
Rodolfo Rivero
Victor Rodriguez
Agustin Romero
Ximena Salaberry
Alejandra Suanes

3- Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Universidad de la República (UdelaR)

Natalia Ashfield
Tamara Iglesias
Clara Menendez
Paulina Meny
Jair Quintero
Cristina Rios
Felipe Schelotto
Gustavo Varela

4- Unidad Mixta Pasteur + INIA, y Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo

Alejandro Buschiazzo
Joaquín Dalla Rizza
Camila Hamond
Juan Imelio
Nicole Larrieux
Cecilia Nieves
Marcos Nieves
Otto Pritsch
Fabiana San Martín
Felipe Trajtenberg
Leticia Zarantonelli