

ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG GIỐNG *LEPTOSPIRA* TẠI VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Nguyễn Trung Tiến¹, Trần Tiến Quân¹, Trần Thị Lan Uyên¹,
Hoàng Thị Thu Hương¹, Đoàn Thị Thanh Hương², Tạ Hoàng Long¹, Phạm Quang Trung¹

TÓM TẮT

Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I hiện đang lưu giữ 6 chủng giống *Leptospira* phục vụ cho nghiên cứu, sản xuất vacxin, chẩn đoán và nhiều mục đích khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá về đặc tính di truyền của 6 chủng xoắn khuẩn trên bằng phương pháp giải trình tự và phân tích ba gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32*. Kết quả phân tích nucleotide và phả hệ đã định danh được 6 chủng *Leptospira* đang lưu giữ thuộc loài *L. interrogans* gồm các serovar *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. pomona*, *L. grippityphosa* và *L. icterohaemorrhagiae*. Cả 6 chủng *Leptospira* lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I đều mang 3 gen quy định các yếu tố độc lực và kháng nguyên quan trọng gồm *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32*.

Từ khóa: *Leptospira*, *OmpL1*, *LipL21*, *LipL32*, serovar.

Identifying *Leptospira* sp. strains in Viet Nam by molecular biology method

Nguyen Trung Tien, Tran Tien Quan, Tran Thi Lan Uyen,
Hoang Thi Thu Huong, Doan Thi Thanh Huong, Ta Hoang Long, Pham Quang Trung

SUMMARY

The National Central for Veterinary Medicine Control No.1 is currently preserving 6 *Leptospira* strains for research, vaccine production, diagnostic and other purposes. Until now, however, no study on molecular characteristics of these strains have been conducted. In this study, molecular characteristics of the six strains of spirochetes were evaluated, basing on sequencing and analyzing three genes: *OmpL1*, *LipL21* and *LipL32*. The result of genotypic and phylogenetic analysis revealed that all 6 *Leptospira* strains belonged to *Leptospira interrogans* species, including six serovar *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. pomona*, *L. grippityphosa* and *L. icterohaemorrhagiae*. All 6 *Leptospira* strains kept at the National Central for Veterinary Medicine Control No.1 carried 3 genes that regulate the important virulence factors and antigens, including *OmpL1*, *LipL21* and *LipL32*.

Keywords: *Leptospira*, *OmpL1*, *LipL21*, *LipL32*, serovar.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Leptospirosis (bệnh xoắn khuẩn vàng da) là một trong những bệnh truyền nhiễm cấp tính ở động vật và có thể lây truyền từ động vật sang người. Bệnh phổ biến trên thế giới, đặc biệt là ở các quốc gia vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Evangelista và Coburn, 2010). Bệnh xảy ra nhiều nhất ở châu Phi, Nam Mỹ và châu Á, gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi và ảnh hưởng đến sức

khỏe con người. Nếu xét về độc lực, *Leptospira* được chia thành 3 nhóm là độc lực cao, độc lực trung bình và không có độc lực. Nhóm *Leptospira* gây bệnh gồm có 13 loài là *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffi*. Trong đó, loài *L. interrogans* và *L. fainei* được xem là có

¹ Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I

² Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

độc lực cao nhất trên người và động vật (Adler và Moctezuma, 2010). Cho đến nay đã xác định được hơn 260 serovar *Leptospira* khác nhau (Levett, 2001). Trong đó, các serovar gây bệnh thường gặp ở lợn là *L. bratislava*, *L. grippityphosa*, *L. canicola*, *L. tarassovi*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. australis*, *L. pomona*; ở bò là *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. australis*, *L. bratislava*, *L. sejroe*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*; ở chó là *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. copenhageni*; ở ngựa là *L. pomona*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hardjo*; ở cừu là *L. pomona*, *L. hardjo* (Faine và cs., 1999; Levett, 2001; Adler và Moctezuma, 2010).

Tại Việt Nam, bệnh được phát hiện lần đầu tiên trên người năm 1931. Từ đó đến nay bệnh vẫn được ghi nhận trên người, trên gia súc, lợn, chó và chuột. Bệnh gây thiệt hại nặng nề về kinh tế, đặc biệt ở những đàn gia súc sinh sản. Các serovar gây bệnh chủ yếu ở trâu gồm *L. mitis*, *L. pomona* và *L. canicola*. Các serovar gây bệnh chủ yếu ở bò sữa gồm *L. bataviae*, *L. ballum*, *L. pyrogenes*, *L. icterohaemorrhagiae* (Lý Thị Liên Khai, 2012). Các serovar gây bệnh chủ yếu ở chó gồm *L. bataviae*, *L. pomona* và *L. canicola* (Vũ Đạt và Lê Huỳnh Thanh Phương, 1999). Cho đến nay Việt Nam vẫn nằm trong vùng dịch tễ nguy cơ cao của bệnh xoắn khuẩn. Việc mua bán gia súc tự do, không qua kiểm dịch thú y làm cho nguy cơ nhiễm bệnh ở gia súc ngày một tăng, đồng thời làm tăng nguy cơ lây nhiễm sang người. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, tỷ lệ vật nuôi nhiễm *Leptospira* khá cao, trong đó chó, lợn, bò là những vật nuôi có tỷ lệ nhiễm *Leptospira* cao nhất từ 22% - 40% (Vũ Đạt và Lê Huỳnh Thanh Phương, 1999; Lý Thị Liên Khai, 2012).

Leptospira là những vi khuẩn gram âm, hiếu khí, có hình móc câu với những hình cuộn xoắn đều đặn. Hệ gen của *Leptospira* spp. có cấu trúc DNA sợi đôi với kích thước dao động từ 3,9 đến 4,6 Mb. Trong hệ gen của xoắn khuẩn có một số gen quan trọng vừa được bảo tồn giữa các serovar khác nhau, vừa quyết định tính kháng nguyên và độc lực của vi khuẩn, bao gồm *OmpL1*, *LipL41*, *LipL32*, *LigA*, *LigB*, *LigC*, *LipL21*, *LipL45* (Jorge et al., 2018). Gen *OmpL1* mã hóa tổng hợp protein bề mặt *OmpL1*, đây là thành phần kháng nguyên chính của loại hình miễn dịch phổ biến, quyết

định hiệu quả tiêm phòng vaccin, đồng thời dùng để chẩn đoán *Leptospirosis*. Gen *LipL21* mã hóa sinh tổng hợp *LipL21* lipoprotein, là chất ức chế myeloperoxidase, tạo thành các yếu tố độc lực của *Leptospira*. *LipL32* là gen tổng hợp lipoprotein màng ngoài *LipL32*, là thành phần quyết định tính kháng nguyên và độc lực của xoắn khuẩn. Chính vì vậy, các gen này là đối tượng chính cho nghiên cứu đặc tính phân tử, định danh loài và phát triển vaccin thế hệ mới.

Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp sinh học phân tử giải mã gen và phân tích trình tự gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32*, kết hợp với phân tích phả hệ nguồn gốc, chúng tôi đã định danh chính xác các chủng *Leptospira* đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I. Đây là cơ sở quan trọng để có chủng giống chuẩn cho các nghiên cứu và phát triển vaccin trong tương lai.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu dùng trong nghiên cứu

- Sáu chủng giống *Leptospira* đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I gồm: *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. pomona* (các chủng này do Viện Thú y phân lập từ năm 1984); *L. grippityphosa* (có nguồn gốc từ Rumania được bảo tồn và lưu giữ tại TTKNTTYTW từ năm 1984 đến nay), *L. icterohaemorrhagiae* (có nguồn gốc từ Nga được bảo tồn và lưu giữ tại TTKNTTYTW từ năm 1984 đến nay); được ký hiệu lần lượt là: B11, C16, MCL, P14, GT và I18.

- Hóa chất và sinh phẩm dùng trong nghiên cứu của hãng Thermo, Mỹ bao gồm bộ kit tách chiết DNA tổng số GeneJET Genomic DNA Purification Kit, (2X) Dream Taq Buffer dùng cho phản ứng PCR và bộ kit GeneJET PCR Purification Kit dùng để tinh sạch sản phẩm PCR.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Thiết kế môi và thu nhận ba gen kháng nguyên *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* của sáu mẫu *Leptospira* nghiên cứu.

- Phân tích phả hệ nguồn gốc, định danh các chủng *Leptospira* đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nuôi cấy xoắn khuẩn

Các giống *Leptospira* được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa môi trường EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson) có bổ sung kháng sinh 5-fluorouracil 100 µg/ml ở nhiệt độ 28°C-30°C. Kiểm tra 2 lần/tuần đến khi thấy các ống môi trường nuôi cấy có hiện tượng vẩn đục như làn khói thì xác định có xoắn khuẩn phát triển. Canh khuẩn nuôi cấy chứa xoắn khuẩn sẽ được sử dụng để tách chiết DNA tổng số.

2.3.2. Tách chiết DNA

DNA được tách chiết bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification kit của hãng Thermo (Mỹ). Mô tả ngắn gọn như sau: Hút 200 µL dịch canh khuẩn vào ống eppendorf sạch, cho thêm 180 µL dung dịch Digestion Solution (DS) và 20 µL Proteinase K solution, lắc bằng tay cho đến khi thành huyền dịch đồng nhất rồi ủ ở 56°C trong 3 giờ. Tiếp theo, bổ sung 20 µL RNase-A, lắc trong 15 giây, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Thêm 200 µL of Lysis Solution (LS), lắc trong 15 giây cho mẫu tan hoàn toàn. Sau đó, thêm 400 µL Ethanol 50% (v/v), lắc hỗn dịch trong khoảng 15 giây; để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Chuyển hỗn dịch sang

cột lọc, ly tâm, loại bỏ phần dung dịch phía dưới. Cho 500 µL dung dịch Washing buffer 1 (AW1) vào cột lọc để rửa DNA, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch ly tâm bên dưới. Cho 500 µL Washing buffer 2 (AW2) vào cột lọc để tiếp tục rửa DNA, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới. Ly tâm lại 13.000 vòng/phút trong 1 phút làm khô màng. Chuyển cột lọc sang ống eppendorf mới, cho 50 µL dung dịch Elution buffer (EL), để ở nhiệt độ phòng trong 4 - 5 phút; sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Bỏ cột, thu dịch bên dưới là DNA của vi khuẩn. Ghi ký hiệu mẫu và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3.3. Thiết kế môi và thực hiện phản ứng PCR

Cặp môi được thiết kế dựa trên so sánh trình tự tương đồng chuỗi nucleotide gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* của tất cả các serovar *Leptospira* hiện có trên Ngân hàng Gen.

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích là 50 µL, sử dụng kit AccuTaqPCR Premix (96 giếng) (Bioneer, Hàn Quốc), bổ sung 2 µL (10 pmol/ µL) mỗi loại môi, 2 µL khuôn DNA (50 ng/ µL), điều chỉnh nước cho phù hợp dung tích 50 µL. Bổ sung 4% DMSO (dimethyl sulfoxide)/phản ứng nhằm tăng cường hoạt động của phản ứng PCR.

Bảng 1. Danh sách các cặp môi dùng cho phản ứng PCR khuếch đại các gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32*

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' – 3')	Gen	Kích thước (bp)
1	OmpL1-F	ATGATCCGTAACATAAGTAAGG	<i>OmpL1</i>	960
	OmpL1-R	TTAGAGTTCGTGTTTATAACC		
2	LipL21- F	AGACTTATAGCTCTATCTTTAGC	<i>LipL21</i>	560
	LipL21- R	TTGTTTGGAAACCTCTTGAG		
3	LipL32-F	ACCTATAGTGCTGCTTTCTC	<i>LipL32</i>	800
	LipL32-R	AGATCCATCAAATTAGCGGAGG		

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy MJ PTC-100 (USA): 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút; 35 chu kỳ: 94°C/1 phút, 42°C/1 phút; 72°C/1 phút 30 giây; chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1% (w/v), nhuộm ethidium bromide và quan sát trên máy soi gel dưới ánh sáng tia cực tím (Wealtech, Mỹ).

2.3.4. Tinh sạch và giải trình tự gen

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR Purification kit (Thermo, Mỹ) và gửi đi giải trình tự trực tiếp tại 1st Base (Singapore).

2.3.5. Phân tích và xử lý số liệu

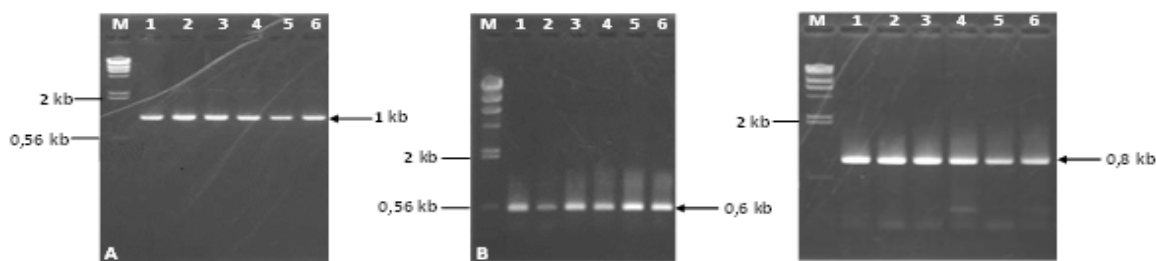
Các trình tự gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* của các chủng *Leptospira* trên Ngân hàng Gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với các chuỗi gen

thu nhận được trong nghiên cứu này bằng chương trình GENEDOC2.7 (Nicholas KB và Nicholas HB, 1997). Cây phả hệ nguồn gốc xây dựng trên trình tự gen *OmpL1* của 6 chủng nghiên cứu và các chủng *Leptospira* trên Ngân hàng Gen bằng phần mềm Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả PCR và giải trình tự gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* của 6 mẫu nghiên cứu

Sử dụng các cặp mồi đã thiết kế, sản phẩm PCR thu được từ các mẫu nghiên cứu có kích thước tương ứng khoảng 1 kb (với gen *OmpL1*); 0,6 kb (với gen *LipL21*) và 0,8 kb (với gen *LipL32*). Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR là một băng đơn sắc, rõ, có chất lượng tốt (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 6 chủng *Leptospira* nghiên cứu trên thạch agarose 1%

A: Sản phẩm PCR gen *OmpL1* (khoảng 1 kb), B: Sản phẩm PCR gen *LipL21* (khoảng 0,6 kb), C: Sản phẩm PCR gen *LipL32* (khoảng 0,8 kb), M: chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể Lambda được cắt bằng *HindIII*, 1: mẫu I18, 2: mẫu P14, 3: mẫu C16, 4: mẫu GT, 5: mẫu B11, 6: mẫu MCL.

Cả sáu mẫu nghiên cứu đều khuếch đại được ba gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* của xoắn khuẩn *Leptospira*. Tất cả các sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp theo phương pháp Sanger tại 1st Base (Singapore) để thu nhận toàn bộ ba gen *OmpL1*, *LipL21* và *LipL32* hoàn chỉnh: gen *OmpL1* có kích thước là 963 nucleotide; gen *LipL32* có kích thước là 819 nucleotide và gen *LipL21* có kích thước là 561 nucleotide. Các trình tự nucleotide thu nhận được truy cập vào Ngân hàng Gen sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các chuỗi gen có tỷ lệ tương đồng cao. Kết quả cho thấy, sáu chủng *Leptospira* nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng cao từ 99-100% với các chủng *L. interrogans* hiện có trong Ngân hàng Gen. Do đó có thể xác định sáu chủng giống *Leptospira* lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I thuộc loài xoắn khuẩn gây bệnh *Leptospira interrogans*.

3.2. Phân tích mối quan hệ phả hệ nguồn gốc

Để định danh đến từng serovar của các chủng

L. interrogans đang lưu giữ, chúng tôi đã xây dựng phả hệ nguồn gốc của các chủng *L. interrogans* nghiên cứu, sử dụng chuỗi nucleotide toàn bộ gen *OmpL1* (963 bp). Kết quả được trình bày ở hình 2.

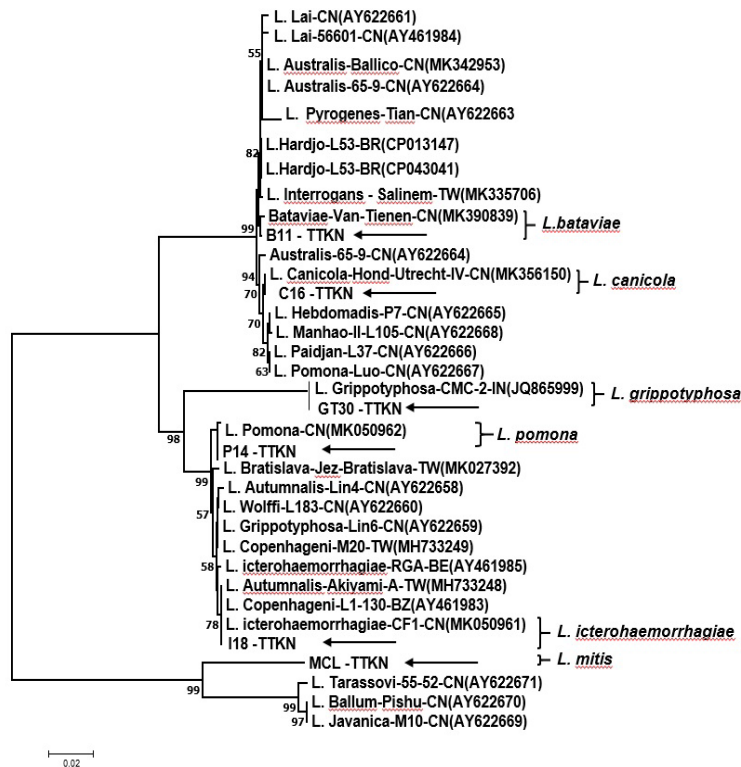
Trước đây việc chẩn đoán xác định *Leptospira* được đánh giá dựa vào triệu chứng lâm sàng, tuy nhiên thực tế đã chứng minh phương pháp này chưa hoàn toàn chính xác (Vasconcellos, 1979). Phương pháp nuôi cấy phân lập xoắn khuẩn là một công việc hết sức khó khăn (WHO, 2013). Trong khi đó chẩn đoán bằng kỹ thuật sinh học phân tử có nhiều ưu thế hơn, dễ thực hiện và có độ chính xác cao (Harkin *et al.*, 2003).

Các phương pháp định danh vi khuẩn thường dựa vào so sánh trình tự nucleotide của gen *16S rRNA*. Tuy nhiên với *Leptospira* thì việc sử dụng gen *16S rRNA* thường chỉ xác định đến loài, nhiều trường hợp không xác định được đến từng serovar. Chính vì vậy để định danh chính từng serovar cần sử dụng các gen đặc trưng của xoắn khuẩn như *OmpL1* và *LipL32*. Việc công bố trình

tự nucleotide của các gen này trên Ngân hàng Gen là một thuận lợi cho việc định danh chính xác các mẫu cần nghiên cứu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, số lượng nucleotide được giải trình tự và phân tích là toàn bộ gen *OmpL1*, do đó kết quả định danh *Leptospira* có độ tin cậy cao.

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên trình tự nucleotide gen *OmpL1* (hình 2) đã xác định được sáu chủng *Leptospira* đang lưu giữ tại

Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I thuộc loài *Leptospira interrogans*, gồm các serovar *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. pomona*, *L. grippityphosa* và *L. icterohaemorrhagiae*. Cho đến nay, các nghiên cứu và công bố về sinh học phân tử của *Leptospira* tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Việc định danh chính xác sáu chủng *Leptospira* tại Việt Nam có ý nghĩa khoa học và giá trị thực tiễn cao, là nguồn gen cho công tác nghiên cứu và phục vụ phát triển sản xuất vaccine trong nước.



Hình 2. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ nguồn gốc giữa các chủng *Leptospira* của Việt Nam và thế giới (có trong Ngân hàng Gen), dựa trên trình tự nucleotide của gen *OmpL1*

Các chủng *Leptospira* trong nghiên cứu này được chỉ dẫn bằng mũi tên, các chủng còn lại là những chủng tham chiếu đã được công bố trên GenBank. 26 chủng tham chiếu gồm: 1. CN (AY622661); 2. 56601 (AY461984), 3. Ballico (MK342953), 4. 65-9 (AY622664), 5. Tian (AY622663), 6. L53 (2018) (CP013147), 7. L53 (2019) (CP043041), 8. Salinem (MK335706), 9. Van-Tiennen (MK390839), 10. Hond-Utrecht-IV (MK356150), 11. P7 (AY622665), 12. II-L105 (AY622668), 13. L37 (AY622666), 14. Luo (622667), 15. CMC-2 (JQ865999), 16. CN (MK050962), 17. Jez-Bratislava (MK027392), 18. Lin 4 (AY622658), 19. L183 (AY622660), 20. Lin6 (AY622659), 21. M20 (MH733249), 22. RGA (AY461985), 23. CF1 (MK050961), 24. 55-52 (AY622671), 25. Pishu (AY622670), 26. M10 (AY622669).

IV. KẾT LUẬN

- Cả 6 chủng *Leptospira* lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I đều mang 3 gen quy định các yếu tố độc lực và kháng nguyên quan trọng gồm *OmpL1*, *LipL21* và *LipL322*.

- Cả 6 chủng *Leptospira* lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I được xác định thuộc loài *Leptospira interrogans* gồm sáu serovar *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. pomona*, *L. grippityphosa* và *L. icterohaemorrhagiae* bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên trình tự nucleotide của gen *OmpL1*.

Lời cảm ơn: Bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của nhiệm vụ “Bảo tồn, lưu giữ nguồn gen vi sinh vật thú y năm 2021”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lý Thị Liên Khai, 2012. Điều tra tình hình nhiễm vi khuẩn *Leptospira* trên đàn bò sữa, chó và chuột tại công ty Cổ phần thủy sản sông Hậu. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ* 21: 87-96.
2. Vũ Đạt, Lê Huỳnh Thanh Phương, 1999. Tình hình nhiễm *Leptospira* ở chó vùng phụ cận Hà Nội. *Kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật Khoa chăn nuôi Thú y (1996-1998)*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội: 74-77.
3. Adler B and Moctezuma ADLP, 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Overview of the biology *Leptospira* and how recent progress in genetic research will contribute to our understanding of *Leptospira* pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 140, (3-4): 287-296.
4. Evangelista, KV and Coburn J, 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5(9): 1413-1425.
5. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. *MediSci*; Melbourne.
6. Harkin KR, Roshto ., Y.M, Sullivan JT, Purvis TJ and Chengappa MM, 2003. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of *Leptospira* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222 (9): 1230 -1233.
7. Jorge S, Kremer FS, Oliveira NR, Navarro G, Pinto LDS, Dellagostin OA, 2018. Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113, 80-86.
8. Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews* 14, 296-326.
9. Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW, 1997. Analysis and visualization of genetic variation. Distributed by authors Available: <http://download.freedomdownloadmanager.org/Windows-PC/GeneDoc/FREE-2.7.html>. Accessed: 14 September 2016.
10. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729.
11. Vasconcellos SA, 1979. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 3: 189-194.
12. WHO, 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Isolation and culture of leptospires: 81-82.

Ngày nhận 26-10-2021

Ngày phản biện 28-11-2021

Ngày đăng 1-3-2022