

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-León

Escuela de Medicina Veterinaria



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Tema: Estandarización de una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos.

Autores:

Br. Eveling Isabeth Pérez López.

Br. Karoll Jeaneth Salgado Saballos.

Tutores: MSc. Byron Flores Somarriba

MSc. Jessica Sheleby Elías

“A la libertad por la universidad”

ÍNDICE

I. Dedicatoria	1
II. Agradecimientos	2
III. Resumen	3
IV. Abreviaturas	4
V. Glosario	6
1. Introducción	9
1.1. Antecedentes.....	11
1.2. Justificación.....	13
1.3. Planteamiento del problema.....	14
2. Objetivo general	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3. Marco teórico	16
3.1. Mecanismo de transmisión.....	17
3.2. Clasificación.....	17
3.3. Patogénesis.....	17
3.4. Sintomatología.....	18
3.5. Diagnóstico	19
3.5.1. Diagnóstico epidemiológico.....	20
3.5.2. Pruebas diagnósticas.....	20

4. Material y método.....	28
5. Resultados.....	32
6. Discusión.....	33
7. Conclusión.....	38
8. Recomendaciones.....	39
9. Bibliografía.....	40
10. Anexos.....	47

I. DEDICATORIA

El siguiente trabajo investigativo se lo quiero dedicar primeramente a Dios, por darme la oportunidad de culminar con éxito cada una de las etapas de mi estudio y por darme la fortaleza y perseverancia para culminar este trabajo.

A mi **abuelita, Domitila Grío**, por darme siempre su apoyo incondicional en todo momento y aconsejarme para culminar cada una de las etapas de mis estudios con éxito, a mi **mamá Karla López** que desde lejos siempre ha estado ahí, apoyándome en todo momento, a mi **padrastró Gerhard Gust** y a mi tío **Sergio López** que han sido participes en mi vida académica en todo momento.

Br. Eveling Isabeth Pérez López

Este trabajo investigativo quiero dedicarlo primeramente y por sobre todas las cosas a Dios, por darme la oportunidad de concluir con éxito cada etapa de mis estudios, y por darme fuerzas y perseverancia al realizar este trabajo.

A mi madre **Janeth Saballos**, a mi tía **Amanda Gutiérrez**, mi hermano **River Salgado** que día a día han sabido dar lo mejor de ellos en todos los aspectos. Depositando en mí su confianza y paciencia para hacer de mí una mejor persona.

Karoll Jeaneth Salgado Saballos

II AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la vida, sabiduría, y perseverancia para vencer los obstáculos que se nos presentaron en nuestro camino y así poder culminar con éxito nuestros estudios.

A nuestros guías en este trabajo investigativo: **Lic. Byron Flores Somarriba, MSc. y Jessica Sheleby Elías, MSc.**, por darnos la oportunidad de trabajar en esta tesis y confiar en que la culminaríamos con éxito.

Al **Dr. William Jirón**, por brindarnos su apoyo incondicional en todo momento y aconsejarnos en culminar nuestra tesis con éxito.

A la **Lic. Brenda Mora** por apoyarnos en todo momento en el laboratorio, por ser una buena profesora y amiga, y ser siempre participe en todo el proceso de elaboración de esta tesis.

III. RESUMEN

La leptospirosis tiene en Nicaragua un comportamiento endemo-epidémico por ello es preciso mejorar su diagnóstico mediante un multiplex PCR. **Objetivo:** Estandarizar una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos. Para esto se debe calcular el límite de detección, la sensibilidad y especificidad así como la clasificación de las cepas de *Leptospira* como saprófita y patógena. **Diseño:** En este estudio se emplearon 30 cepas distribuidas en 24 serogrupos de *Leptospira*. Se tomaron parámetros como tipos de mezclas, extracción por calentamiento y por el Kit comercial QUIAGEN, la presencia de 5- fluoracilo y muestras fingidas de sangre y orina de diferentes especies (canino, equino, porcino y bovino). La sensibilidad se determinó al calcular la cantidad de ADN capaz de detectar en muestras de sangre y orina. La especificidad se demostró con el uso de ADN de otros agentes patógenos. **Resultados:** De las 30 cepas que se sometieron al ensayo se detectaron 15 siendo correspondiente a 12 serogrupos. La mezcla más efectiva fue la mezcla 1. Los ensayos realizados con y sin 5-fluoracilo no mostraron diferencia en la capacidad para detectar la *Leptospira*. La extracción más adecuada resultó ser por calentamiento, en la que se identificaron 8 muestras de 19, mientras que por extracción con kit comercial sólo 2 muestras de 8. La técnica es capaz de identificar una concentración de 0.012 pg de ADN de *Leptospira* correspondiente a una dilución 1:10000. La sensibilidad mostrada fue de 50% IC^{95%} (30.44 – 69.56) mientras que la especificidad fue de 100% IC^{95%} (95 – 100). **Conclusión:** La PCR multiplex fue estandarizada mostrando su utilidad en el diagnóstico temprano de animales portadores, lo que será importante para la identificación de zonas vulnerables a la aparición de casos de leptospirosis humana a si como una respuesta temprana en el abordaje integral de brotes.

IV. ABREVIATURA

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosómico.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNr: El ARN ribosómico.

CF: Fijación de complemento.

CGH: Hibridación Genómica Comparada.

dATP: Trifosfato de desoxiadenosina, del inglés deoxyadenosine triphosphate.

dCTP: Trifosfato de desoxicitidina, del inglés deoxycytidine triphosphate.

dGTP: Trifosfato de desoxiguanosina, del inglés deoxyguanosine triphosphate.

dTTP: Trifosfato de desoxitimidin, del inglés deoxythymidine triphosphate.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMJH: Ellinghausen-McClough-Johnson-Harries.

Et al.: Procede de la expresión latín et alii, que significa 'y otros'.

IC: Intervalo de confianza.

IG: Inmunoglobulina.

KCl: Cloruro de potasio.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

MAT: Prueba de Aglutinación Microscópica (por sus siglas en inglés)

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

NaCl: Cloruro de sodio.

Ng: Nanogramo.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

Pb: Pares de bases.

Pg: Picogramo.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés).

RFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (por sus siglas en inglés).

Spp.: Especies.

SSCP: Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (por sus siglas en inglés).

V. GLOSARIO

Aglutinación: Agrupamiento en pequeños cúmulos de cuerpos formes (microbios, hematíes) portadores de un antígeno y en suspensión en un líquido originado cuando se introduce el anticuerpo correspondiente en el líquido.

Amplicones: conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esencialmente se trata de un clon molecular.

Anticuerpo: Es una proteína producida por el sistema inmunitario del cuerpo cuando detecta sustancias dañinas, llamadas antígenos.

Antígeno: Toda sustancia que, introducida en un organismo que no la poseía, provoca en él la formación de un anticuerpo específico con el cual puede combinarse de forma electiva.

Cebadores: Oligonucleótido de 5-20 nucleótidos de longitud que sirve como punto de partida para la replicación de ADN.

Desnaturalización: cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

Electroforesis: La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Endemicidad: Persistencia en una región de una enfermedad particular, bien porque está presente constantemente o bien porque reaparece en épocas determinadas.

Endemoepidémico: aumento de incidencia superior al esperado en el contexto de una epidemia.

Endonucleasa: es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a este. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos.

Espiroquetas: Protozooario espiral de cuerpo delgado y flexible, que se desplaza por movimientos activos. Las espiroquetas son bacterias que poseen unas características morfológicas y unos órganos de locomoción que les diferencian del resto de las bacterias.

Gen: Un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN, en el caso de algunos virus) que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas pero también ARNm, ARNr y ARNt.

Genoma: es todo el ADN de un organismo, incluidos sus genes, unos treinta mil en el caso de los humanos (hasta hace poco se pensaba que eran sobre ochenta mil).

Glicoproteínas: moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).

Leptospirosis: enfermedad infecto-contagiosa que afecta a los seres humanos, los animales domésticos y silvestres.

Lisis: Rompimiento de la membrana celular.

Monoclonal: es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

Nucleasa: son enzimas que pueden ser tanto ribonucleasas (RNasas) como desoxirribonucleasas (DNasas), las primeras hidrolizan al ARN y las segundas al ADN.

Nucleótidos: son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Opsonización: proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito.

Oligonucleótidos: es una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

Patógena: es todo agente que puede producir enfermedad.

Polimerasa: La polimerasa es una enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Polimorfismo: hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

Saprófita: bacterias que no se desarrollan en el organismo vivo y que se alimentan de los desperdicios de alimentos generados por el propio organismo.

Serotipo: Categoría en la que se clasifican los microbios o los virus según su reacción en presencia de suero que contiene anticuerpos específicos.

Tamizaje: exámenes aplicados con el fin de identificar una población, aparentemente sana, en mayor riesgo de tener una determinada enfermedad, que hasta ese momento no se les ha diagnosticado.

1. INTRODUCCIÓN

Las *Leptospira* son bacterias Gram negativas que miden 0-1µm de diámetro y 6-20µm de largo. Estas espiroquetas pertenecen a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales* y clásicamente comprenden 2 especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*, siendo la primera patógena y la segunda, saprófita. *Leptospira interrogans* incluye alrededor de 23 serogrupos y 218 serovares y *L. biflexa*, 28 serogrupos y 60 serovares (Zunido et al, 2007; Desvars et al, 2008).

Los huéspedes reservorios son los animales silvestres y domésticos, aunque el agente también se ha aislado de otros vertebrados, como aves y anfibios, los que eliminan las *Leptospira* con la orina por periodos de tiempos variables, dependiendo de la especie animal (Céspedes et al, 2007).

La leptospirosis tiene en Nicaragua un comportamiento endemo-epidémico, con una notificación 2 casos como promedio semanal. En el período de lluvias (octubre-noviembre) este promedio semanal se eleva hasta 8 casos. La región Occidental (Departamentos de León y Chinandega), son los que con más frecuencia reportan la ocurrencia de brotes epidémicos.

Los cuadros de leptospirosis humana en cuya fase terminal ocurre la hemorragia pulmonar se han presentado en Nicaragua a partir de 1995 con grandes brotes epidémicos en 1995, 1998 y 2007, todos ellos asociados a intensas lluvias (Peláez et al, 2007).

En Nicaragua como en el resto de países del mundo la prueba de oro para el diagnóstico de *Leptospira* es la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) (OPS, 2008), sin embargo esta técnica tiene desventajas tales como: no diferencia entre anticuerpos vacunales y de infección, utiliza como antígeno *Leptospira* vivas, siendo tedioso el mantenimiento de las cepas y un riesgo potencial para el personal del laboratorio. Para obtener una sensibilidad adecuada, se deben utilizar como antígenos cepas representativas de todos los serogrupos presentes en el país o región y de todos los serovares adaptados a la especie objeto de estudio.

Otro método directo de diagnóstico es el cultivo pero es limitado y requiere de mucho tiempo (Alonso et al, 2001).

Diversos estudios han demostrado una sensibilidad y especificidad de la PCR de hasta el 100%, siendo así una herramienta útil en el diagnóstico precoz de leptospirosis sobre todo en las formas graves de la enfermedad. (Céspedes et al, 2007)

Por las razones citadas anteriormente se pretende estandarizar una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos, y así validar su alta sensibilidad y especificidad. Esta técnica ha servido para detectar e identificar *Leptospira* en sangre, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y orina. Además puede diferenciar con rapidez las formas patógenas de las no patógenas. (Green et al, 2008).

1.1. ANTECEDENTES

En 2001, se llevó a cabo la identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos en tres provincias de Cuba. Se estudiaron 18 cepas de *Leptospira*, aisladas de pacientes con leptospirosis humana, en los resultados por MAT las cepas fueron agrupadas entre los serogrupos *ballum*, *pomona*, *canícola* e *icterohaemorrhagiae*. Se determinó el serovar de 7 de las cepas estudiadas con el uso de los anticuerpos monoclonales. Para la totalidad de las cepas se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa un fragmento amplificado de 631 pb. El análisis con enzimas de restricción del producto amplificado, originó iguales patrones de restricción en todas las cepas estudiadas (Victoria et al, 2001).

En 2007 se efectuó la detección de *Leptospira* patógenas en animales por PCR basado en los genes lipL21 y lipL32, en India. Se recogieron muestras de suero y tejido de bovinos, búfalos y cobayos junto a becerros experimentalmente infectados. A los cuales se les realizó PCR usando los genes lipL21 y lipL32 así como los cebadores G1/G2, y se determinó que todos los sueros, tanto las muestras colectada en campo, como la de los animales infectados experimentalmente, fueron positivos tanto con el uso de cebadores G1/G2 así como con los genes lipL21 y lipL32 (Cheema et al, 2006).

Se desarrolló un estudio para la detección y diferenciación entre *Leptospira* spp. patógenas y saprófitas por multiplex PCR en la ciudad de Bangkok, Tailandia. Este método pudo amplificar 27 serovares patógenos y 5 serovares saprófitas, mostrando una amplificación de 615 y 316 pares de bases (pb), respectivamente. (Kositanont et al, 2007).

En 2007 se llevó a cabo la estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de leptospirosis humana en zonas endémicas del Perú. Amplificó el ADN de 25 serovares de seis especies de *Leptospira* spp. No amplificó las muestras de ADN de otros microorganismos patógenos. La sensibilidad y especificidad del método fue 100% *in vitro*. Su sensibilidad fue de

100% (IC95: 97,9 - 100%) en muestras de sangre antes de los ocho primeros días de enfermedad y de 30% (IC^{95%}: 16,3 - 43-,7) cuando el tiempo de enfermedad fue mayor. El PCR en orina tiene una baja sensibilidad. (Céspedes et al, 2007).

En 2009, se realizó la detección de *Leptospira* patógenas en tejido renal de perros vagos, mediante PCR en tiempo real, en la ciudad de Chillan, Chile. De los 72 perros a los que se les extrajo ADN de tejido renal, el 59.7% de los perros resultó infectado. (Campos, 2009).

En 2010, se realizó un estudio para la aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia, los resultados más consistentes fueron obtenidos con la PCR simple *lipL32* tanto en límite de detección, especificidad y utilidad para la identificación de *Leptospira* spp. (Moreno et al, 2010).

Una multiplex PCR fue desarrollada para la detección de *Leptospira* en muestras de agua del ambiente obtenidas en un asentamiento de barrio en Petrópolis, ciudad de Rio de Janeiro. Tres de las 100 muestras analizadas fueron positivas en la multiplex PCR, se consideró que dos muestras tenían *Leptospira* saprófitas y una *Leptospira* patógenas. (Vital et al, 2010).

En 2012, se caracterizó aislamientos clínicos de *Leptospira* por métodos fenotípicos y moleculares en la república de Nicaragua. De las 8 cepas de *Leptospira* aisladas de casos clínicos mediante métodos fenotípicos y moleculares, para el primer método ninguna de estas mostraron crecimiento a 13°C en medio suplementado con 8-azaguanina (2,25 mg/MI) y para el segundo método los resultados de este ensayo demostraron la presencia de bandas de amplificación de los genes *OmpL1* y *lipL32* para los ocho aislamientos (Rosario et al, 2012).

1.2. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta a los mamíferos tanto domésticos como silvestres, aunque el agente también se ha aislado de otros vertebrados, como aves y anfibios. La enfermedad puede estar causada por cualquiera de las espiroquetas parásitas clasificadas dentro del género *Leptospira* (Alonso et al, 2001).

Es una zoonosis en Nicaragua que presenta una endemicidad constante, tal y como lo demuestran las estadísticas de la enfermedad principalmente después de lluvias fuertes e inundaciones. Afectando de igual manera a humanos y animales produciendo un gran impacto socioeconómico para la población en general.

El diagnóstico de la enfermedad es complejo, debido a que no manifiesta síntomas específicos, y resulta difícil realizar e interpretar los métodos diagnósticos de referencia en base a cultivos bacterianos y a test serológicos para la identificación de la especie y serovares (Levett et al, 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una prueba de diagnóstico molecular muy sensible y específico que sirve para detectar e identificar *Leptospira* en sangre, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y orina. Esta técnica puede diferenciar con rapidez las formas patógenas de las no patógenas (Greene et al, 2008). Sin embargo la técnica debe ser estandarizada en cada laboratorio antes de ser utilizada en el diagnóstico y vigilancia de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue estandarizar una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos. Esta técnica proporcionará una alternativa más rápida que el aislamiento, así como una clasificación confiable de *Leptospira* patógenas y saprófitas circulante en animales domésticos.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los parámetros óptimos en la estandarización de una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos?

2. OBJETIVOS

2.1. General:

Estandarizar una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos.

2.2. Específico:

Establecer el límite de detección de multiplex PCR en muestras sanguíneas y orina.

Determinar la sensibilidad y especificidad de multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira*.

Clasificar las cepas de *Leptospira* como saprófita y patógena a través de multiplex PCR.

3. MARCO TEÓRICO

Las *Leptospira* son bacterias pertenecientes al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*. Aunque son bacterias Gram negativas, no se tiñen bien mediante los colorantes convencionales, por lo que habitualmente se visualizan por medio de la microscopía de campo oscuro. La impregnación argéntica y las técnicas de inmunohistoquímicas se utilizan para poner en manifiesto su presencia en tejidos (Quinn et al, 2002).

Su tamaño es de 0,25 por 6-25 μm , tienen forma cilíndrica y helicoidal, con dos filamentos axiales insertados en los extremos del cuerpo celular, que actúan como citoesqueleto y le permiten el movimiento (Bharti et al, 2003).

Estas son móviles, describen tres tipos de movimientos: rotación alrededor de su eje central, movimientos progresivos rectos y movimientos circulares (Bharti et al, 2003), son aerobios obligados, que se desarrollan a una temperatura de 28 a 30°C. Son catalasa y oxidasa positivo, creciendo en medios simples enriquecidos con vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio (Levett, 2001). Su genoma consiste en dos cromosomas circulares, uno de mayor tamaño que asciende a 4.332.241 bp, y uno pequeño de 358.943 bp, los que juntos suman 4.691.184 bp (Ren et al, 2003).

La bacteria no se multiplica fuera del huésped y es considerablemente dependiente del medio, puesto que es muy susceptible a la desecación, a pH inferiores a 6 o superiores a 8, y temperaturas menores a 10°C o mayores a 34°C, le resultan nocivos (McDonough, 2001). Así como la luz solar directa, la hipersalinidad, los desinfectantes corrientes, los detergentes y el jabón, pueden afectar al microorganismo (Zamora et al, 1999).

Los organismos de *Leptospira* sobreviven hasta 180 días en suelos húmedos, por varios meses en superficies acuosas y sobreviven aún mejor en agua estancada que en movimiento (McDonough, 2001; Acosta et al., 1994).

3.1. Mecanismos de transmisión

Las *Leptospira* se transmiten por contacto directo o indirecto. La transmisión directa ocurre a través de orina infectada, transferencia venérea o transplacentaria, heridas por mordedura o ingestión de tejidos infectados. La transmisión indirecta se da a través de la exposición de los animales susceptibles, agua, suelo, alimento o camas contaminadas (Greene et al, 2008).

Existen dos tipos de huéspedes involucrados en la transmisión de la enfermedad. Los huéspedes primarios, constituidos por aquellas especies que no desarrollan una sintomatología evidente y que son capaces de eliminar por periodos prolongados la bacteria y los huéspedes secundarios, conformados por aquellas especies, que por el contrario, enferman gravemente y no alcanzan a liberar la bacteria o lo hacen por un periodo reducido (McDonough, 2001).

3.2. Clasificación

A partir de 1989 el género *Leptospira* fue dividido en dos especies, *L. interrogans* que comprendía a todas las cepas patógenas y *L. biflexa* que incluía a las cepas saprófitas aisladas del medio ambiente. Ambas fueron divididas en numerosos serovares, definidos por aglutinación. Sobre 60 y 200 serovares han sido reconocidos para *L. biflexa* y *L. interrogans*, respectivamente. Los serovares que se encontraban relacionados antigénicamente fueron agrupados como serogrupos (Levett, 2001).

3.3. Patogénesis

La *Leptospira* es resistente a la actividad bactericida del suero normal, y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos. Después de penetrar la piel o las mucosas, la *Leptospira* hace una bacteriemia que inicialmente alcanza todas las partes del cuerpo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los ojos, y genera la producción de anticuerpos aglutinantes y el fenómeno de opsonización entre los días 5 y 7. Si esta respuesta no es suficiente para detener su progreso, la

Leptospira avanza en los tejidos. Allí se multiplica en forma acelerada, deja de ser encontrada en la sangre y se elimina por la orina durante semanas o meses (fase inmune o de leptospiuria) (Acosta et al, 1994).

La leptospirosis puede presentarse con diferentes formas, grados y combinaciones de compromiso orgánico, ya sea como un cuadro febril inespecífico, como afección preferente de uno o más órganos involucrados, o como una enfermedad grave con compromiso multiorgánico y alta letalidad (Zunino y Pizarro, 2007).

La etapa aguda o septicémica de alrededor de 1 semana, seguida de una fase inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y eliminación de la bacteria a través de la orina. La mayor complicación de la patología, se encuentra asociada a la localización de las bacterias en los tejidos durante la fase inmune, alrededor de la segunda semana de la patología (Levett, 2001).

En animales susceptibles, la lesión de las membranas de los glóbulos rojos y de las células endoteliales, junto con el daño hepatocelular, desencadena anemia hemolítica, ictericia, hemoglobinuria y hemorragia (Quinn et al, 2002).

La superficie de las células bacterianas constituye una interfase entre el patógeno y el hospedador, formando un sitio de interacción con los tejidos durante la infección. Para los patógenos extracelulares la superficie bacteriana es también el blanco de la respuesta inmune del hospedador (Cullen et al, 2005). Se ha señalado que LipL32 interactúa con componentes de la matriz extracelular como el colágeno y que existe una respuesta de inmunoglobulina M contra la lipoproteína durante la fase aguda y convaleciente de leptospirosis en humanos (Hauk et al, 2008).

3.4. Sintomatología

Las manifestaciones oculares incluyen efusión conjuntival, presencia de ictericia en la esclerótica y uveítis. Esta última puede ser unilateral o bilateral y puede presentarse semanas, meses y ocasionalmente en años, posterior a la enfermedad aguda (Levett, 2001).

Las alteraciones reproductivas pueden ocurrir posterior a una infección y la leptospirosis debe ser considerada como diagnóstico diferencial en casos de aborto o muerte perinatal (André Fontaine, 2006).

En bovinos, la enfermedad puede ser aguda, subaguda y crónica. En la forma aguda son más susceptibles los animales de un mes de edad. Se caracteriza por septicemia, fiebre de 40.5 C°, anorexia, petequias en mucosas, depresión, ictericia, anemia hemolítica con hemoglobinuria, palidez de las mucosas, disnea suele ocurrir aborto, baja de la producción de la leche y ocasionalmente mastitis.

En la forma subaguda se presentan los mismos síntomas, la fiebre es de 39 a 40 C°, existe baja de la producción láctea y esta es de color rojo o anaranjado amarillento. En la forma crónica, generalmente los síntomas son aborto, que se presenta en el último tercio de la gestación; ocasionalmente se puede presentar meningitis leptospirósica, incoordinación, sialorrea, conjuntivitis y rigidez muscular.

En porcinos, generalmente se presenta la forma crónica; en ovinos y caprinos no se conoce mucho la enfermedad debido a su poca frecuencia y la mayor parte de los animales afectados se encuentran muertos con apariencia septicémica; en equinos, se presenta la forma subaguda; en perros y gatos se presenta la enfermedad desde formas subclínicas hasta formas graves; en animales silvestres, la mayoría están adaptados y no manifiestan síntomas clínicos (Acha et al, 1978).

3.5. Diagnóstico

Debido a que las manifestaciones clínicas de la leptospirosis varían en tipo y gravedad tanto en los humanos como en animales, es difícil su diagnóstico clínico, haciéndose necesaria la confirmación de los casos mediante pruebas de laboratorio; existen pruebas que sin ser específicas para la enfermedad pueden orientar al clínico hacia el diagnóstico de leptospirosis (Céspedes, 2005).

3.5.1. Diagnóstico epidemiológico

La anamnesis debe incluir datos sobre la época del año en la que apareció el brote, la aptitud del rebaño, el estado sanitario del mismo, el contacto con otras especies domésticas, la sintomatología predominante y si se realiza vacunación frente a la leptospirosis. Asimismo, deberá obtenerse información sobre el número de animales afectados, la edad de los mismos y la fase de la gestación en que se produce el aborto (Alonso et al, 2001).

3.5.2. Pruebas Diagnósticas

Se basa en el cultivo del organismo, la demostración serológica o el diagnóstico molecular (Dammert, 2005).

3.5.2.1. Cultivo:

La *Leptospira* se puede aislar de muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo en los primeros 7-10 días de la enfermedad y en la orina puede ser detectada durante la segunda y tercera semana de la enfermedad (Bharti, 2003). Una vez tomada la muestra esta se debe inocular en 10 ml de medio semisólido que contenga 5-fluoracilo.

El cultivo debe ser incubado a 28-30 °C y ser examinado semanalmente en el microscopio de campo oscuro durante 13 semanas antes de ser descartado. Los cultivos contaminados pueden ser filtrados antes de recultivarlos a un medio nuevo (Levett, 2001).

Existen otros medios recientemente desarrollados, útiles en el aislamiento de la *Leptospira*: medio EMJH (Ellinghausen y McIlough, modificado por Johnson y Harries) y el medio Tween 80-albúmina, este último considerado el mejor.

Como el cultivo tiene el inconveniente de ser muy largo (5-6 semanas de incubación), no se debe considerar para definir una conducta terapéutica inicial (Acosta et al., 1994).

3.5.2.2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el rebaño y para realizar los estudios epidemiológicos. Los anticuerpos de las *Leptospira* aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses y, en algunos casos, años. Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos puede que desciendan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente. Para superar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el microorganismo en la orina o en el tracto genital de portadores crónicos.

Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo. La prueba de la aglutinación microscópica (MAT) y el enzimoimmunoensayo (ELISA) contribuyen al diagnóstico veterinario (OIE, 2008).

3.5.2.2.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT): La prueba MAT en la que se emplean antígenos vivos es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Constituye la prueba de referencia frente a la que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para la importación/exportación (OIE, 2008).

El MAT posee una alta sensibilidad y especificidad, siendo sus resultados utilizados para identificar el serovar o serogrupo infectante, pero requiere de la experiencia del operador y la variación diagnóstica entre laboratorios es elevada (Bharti *et al*, 2003). Para llevarlo a cabo se requiere que el laboratorio cuente con cultivos vivos de todos los serovares, para emplearlos como antígenos, considerándose que su interpretación es complicada debido a la alta degradación,

presencia de reacción cruzada entre diferentes serogrupos y a reacciones paradójicas (Levett, 2001).

3.5.2.2.2. Otras pruebas serológicas: Debido a la complejidad de la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT), se ha desarrollado otras pruebas serológicas para la detección de anticuerpos antileptospira en la fase aguda de la infección. La fijación de complemento (CF) fue ampliamente usado, pero el método no fue estandarizado. La prueba de Fijación de complemento ha sido reemplazada por el método ELISA (Levett, 2001).

El ELISA se utiliza tanto para la detección de anticuerpos en la leche como en el suero, permitiendo, además diferenciar entre IgG e IgM (Alonso et al, 2001). En este ensayo se detecta IgM antileptospira tan solo 1 semana después de la infección, antes de que estén presentes los anticuerpos aglutinantes. Los anticuerpos IgG se detectan, comenzando 2 semanas después de la infección, y persisten durante largos periodos de tiempo (OIE, 2008).

La detección de IgM en suero por ELISA, es más sensible que el MAT cuando la primera muestra se toma en la fase aguda de la enfermedad (Céspedes, 2005). Además, presenta otras ventajas frente al MAT, como es el hecho de no presentar riesgo sanitario para los operarios, ser de fácil estandarización y ser una prueba en la que las reacciones cruzadas son poco frecuentes. Sus principales desventajas son que normalmente son serovar específicos, con lo cual no obtendremos información acerca de una posible infección por otros serovares, y que no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección (Alonso et al, 2001).

3.5.2.3. Diagnóstico molecular

3.5.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma

exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación (Rodríguez et al, 2004).

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como desnaturalización (Satz et al, 1993). En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs (Rodríguez et al, 2004). Por último se da la reacción de extensión, que generalmente es llevada a cabo a una temperatura intermedia, en la cual la ADN polimerasa copia el ADN entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos iniciadores (Torres et al, 1995). La detección se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Costa, 2004).

En los últimos años se ha desarrollado PCR en muestras biológicas como orina, suero, líquido cefalorraquídeo y tejido renal, posicionándose la técnica como una herramienta de diagnóstico sensible y específica en la detección e identificación de *Leptospira* spp. (Levett, 2001; Branger et al, 2005).

Una limitación de diagnóstico basado en la PCR de la leptospirosis es la incapacidad de la mayoría de los ensayos de PCR para identificar el serovar infectante. Si bien esto no es significativo para la gestión individual del paciente, la identidad del serovar tiene un importante valor epidemiológico y en salud pública.

Las estrategias diseñadas para superar este obstáculo han incluido la digestión de productos de PCR con endonucleasas de restricción, secuenciación directa de los amplicones, y Análisis de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP). Genomoespecies de *Leptospira* pueden ser diferenciadas después de la PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante, seguido por tinción con plata, y sin el paso adicional de purificación y desnaturalización (Ahmad et al, 2005).

3.5.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

La PCR múltiple son reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés. (Mendez et al, 2004)

3.5.2.3.3. Fingerprinting

Un desarrollo reciente en el análisis del ADN, ribotipificación, se basa en el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Posterior a la electroforesis del gel Agarosa, el ADN es transferido sobre una membrana y posteriormente hibridado con sondas marcadas desde el 16S al 23S de la cadena de ARN por lo tanto nos da una interpretación más rápida y fácil del Fingerprints. Este método es una herramienta útil para la tipificación molecular de *Leptospira*, ya que esta metodología utiliza reactivos disponibles comercialmente, puede ser aplicada por laboratorio de diagnóstico y no requiere el mantenimiento de todas las cepas de referencia y correspondientemente suero inmune de conejo. La tipificación ribosomal también nos provee información sobre la relación genómica, basado en la similitud que tienen en común fragmentos de cadenas de *Leptospira* (Terpstra et al, 1986).

3.5.2.3.4. Anticuerpo monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son glicoproteínas especializadas que hacen parte del sistema inmune, producidas por las células B, con la capacidad de conocer moléculas específicas (Antígenos). Los anticuerpos monoclonales son

herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, así como también en el estudio de las interacciones patógenas-hospedador y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas (Machado et al, 2006).

Se han preparado anticuerpos monoclonales de conejo que aglutinan *Leptospira* y los serovares pueden ser identificados con base en patrones característicos de aglutinación. Preparar anticuerpos monoclonales es difícil y toma tiempo, pero usarlos en la MAT para serotipificar es fácil y da resultados rápidos. Actualmente están disponibles anticuerpos monoclonales para tipificar cerca de la mitad de los serovares más comunes actualmente reconocidos (OMS, 2008).

3.5.2.3.5. Secuenciación del ARNr 16S

La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra clínica.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia (Rodicio et al 2004).

La secuenciación del ARNr 16S es un método potente y simplificado para la identificación de especies *Leptospira* (Morey et al. 2006).

3.5.2.3.6. Microarrays

El análisis de microarray consiste en la detección e identificación simultánea de un patógeno desde la misma muestra, para así ser implementado en los laboratorios clínicos de microbiología con facilidad y exactitud.

Microarray simplemente se define como una colección de características microscópicas (más comúnmente ADN) que se puede probar con moléculas diana

para producir ya sea (expresión génica) cuantitativa o los datos cualitativos (diagnóstico).

El análisis por medio de microarray tiene la capacidad de ofrecer una fuerte detección múltiple. Existen plataformas de microarrays múltiples, incluyendo impresos de ADN de doble cadena y matrices de oligonucleótidos.

Los microarrays permiten el depósito de miles de puntos conteniendo genes o parte de genes sobre un portaobjetos para su estudio en paralelo. De esta manera es posible tener una visión instantánea de actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes (Miller et al, 2009).

En los estudios de microarrays se combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

Una condición indispensable es que cada uno de los genes que esté representado sea fácilmente distinguible de otros. En otras palabras la porción del gen inmovilizada en el portaobjeto debe llevar consigo, independientemente de su tamaño, su cédula de identidad (Barrero, 2005).

La hibridación genómica comparada (CGH) ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para las comparaciones genómicas de alto rendimiento entre especies patógenas y no patógenas y la exploración del genoma de muchas especies bacterianas. Las secuencias genómicas disponibles de *L. interrogans* serovar *Lai* y *copenhageni* se utilizaron para diseñar una matriz de mosaico (Eribo et al, 2012).

3.5.2.3.7. Enzimas de Restricción

El método consiste en la extracción de ADN a partir de una población homogénea de organismos, la digestión del ADN con una endonucleasa de restricción, y la

electroforesis en gel de agarosa del ADN. Debido a que las endonucleasas de restricción reconocen y se unen al ADN de doble cadena específicamente a la secuencia 4 ó 6 de pares de bases, se genera un conjunto de fragmentos. La migración de estos fragmentos en gel de agarosa está relacionada con el peso molecular; un patrón de bandas se puede ver en el gel por la luz ultravioleta si se tiñeron con bromuro de etidio, o por autorradiografía. Estos modelos constituyen una "huella digital" característico de cualquier ADN en particular (Marshall et al, 1981).

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Tipo de estudio: Ensayo de laboratorio

4.2. Cepas: En este estudio se emplearon 30 cepas distribuidas en 24 serogrupos de *Leptospira*, proporcionados por Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

4.3. Muestras: Las condiciones de crecimiento para la *Leptospira* fueron de 28-30°C durante siete días en el medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH).

4.5. PCR cebadores y condiciones de amplificación

Los cebadores de oligonucleótidos LepF1, PU1 y LepR1, que corresponden a las posiciones 8461 a 8480, 8720 a 8738, y 9334 a 9316, respectivamente, fueron diseñados para unirse a región 23S del ADNr la cual corresponde a la secuencia de *Leptospira interrogans* (patógena).

Los cebadores SU1 y LepR1 fueron diseñados para serovares de saprófitas, que corresponden a la posición 326 a 343 y 641 a 623, respectivamente, basado en la secuencia parcial del ADNr de *Leptospira biflexa*. La secuencia de los cebadores se demuestra en la tabla 1.

Tabla1. Cebadores utilizados en la amplificación

Cebador	Secuenciación 5' a 3'	Especificidad	Posición de la base
LepF1	GTTACCAAGCACAAGATTAG	<i>Leptospira</i> spp.	8461 - 8480
LepR1	TAGTCCCGATTACATTTTC	<i>Leptospira</i> spp.	9334 - 9316
PU1	TATCAGAGCCTT TTAATGG	Patógena	8720 - 8738
SU1	TTTAGGGTTAGCGTGGTA	Saprófita	326 - 343
LepR1	TAGTCCCGATTACATTTTC	<i>Leptospira</i> spp.	641 - 623

El ADN de la *Leptospira* fue amplificado usando LepF1 (5' GTTACCAAGCACAAGATTAG 3') y LepR1 (5' TAGTCCCGATTACATTTTC 3'). Para la multiplex PCR fueron usado como cebadores internos: PU1 (5'

TATCAGAGCCTTTTAATGG 3'), SU1 (5' TTTAGGGTTAGCGTGGTA 3'), y LepR1 (5' TAGTCCCGATTACATTTTC 3').

Para la amplificación del ADN se utilizó como control positivo de patógena la cepa *icterohaemorrhagiae*, mientras que como control de saprófita se utilizó la cepa *patoc* ambas se encontraban en caldo de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasa.

Los segmentos de ADN amplificado para patógenas corresponde a 615 pb y para saprófitas 316 pb (gen 23S ADNr). Esta amplificación fue realizada en el termociclador. Las condiciones de la PCR consistieron en 40 ciclos. Una desnaturalización inicial fue de 94°C por 5 minutos. Cada ciclo comprendió una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, temperatura de aneling a 50°C por 50 segundos, y una extensión a 72°C por 1 minuto. El último paso fue la elongación a 72°C por 7 minutos.

4.6. Parámetros a probar en la estandarización:

4.6.1. Mezcla:

Se sometieron a prueba tres tipos de mezcla cada una con concentraciones distintas pero con un volumen final de 50 µl reflejadas en la tabla 2:

Tabla 2. Mezclas de reactivos puestas a prueba

Componente	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Agua free nucleasa	19 µl	26 µl	14 µl
Master mix	16 µl	8 µl	16 µl
Cebador 1 (LepF1)	2 µl	2 µl	2 µl
Cebador 2-5 (LepR1)	4 µl	2 µl	4 µl
Cebador 3 (PU1)	2 µl	1 µl	2 µl
Cebador 4 (SU1)	2 µl	1 µl	2 µl
AND (muestral o control)	5 µl	10 µl	10 µl
Volumen final	50 µl	50 µl	50 µl

4.6.2. 5-Fluoracilo:

Se puso a prueba el papel que juega el 5-fluoracilo debido a su utilización en los medios de cultivo para evitar la contaminación bacteriana de las *Leptospira* además que permite un mejor crecimiento de éstas (WHO, 1967). Su eficacia radica en que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. La timina es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ADN, y su carencia implica que el ADN no se puede replicar, lo que inhibe la división celular (Botana et al, 2002).

4.6.3. Tipo de extracción de ADN:

El ADN genómico de las cepas de *Leptospira* y de las muestras sanguíneas y orina fue extraído de acuerdo a las instrucciones del kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®), siguiendo los procedimientos de manufactura (ver anexo 1).

Se ensayaron extracciones por calentamiento a 90°C – 100°C por 20 minutos. El ADN extraído fue almacenado a -20° C hasta su amplificación.

4.6.4. Muestras fingidas:

Se obtuvieron muestras de suero y orina de cada especie (canino, bovino, porcino y equino) y se mezclaron con cepas de referencia proporcionados por el Centro Nacional De Investigación de Holanda, para posteriormente realizar PCR. A cada muestra se le realizó extracciones por calentamiento y por el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®).

4.7. Determinación del límite de detección:

Se determinó al calcular la cantidad de ADN que capaz de detectar la técnica en un ml de muestras de sangre y orina, para esto se realizó una serie de diluciones (desde 1:1 hasta 1:10000000) de las muestras a partir de una concentración de ADN conocida (120 ng).

4.8. Sensibilidad:

Se sometieron 29 serovares patógenas y 1 saprófita como controles positivos proporcionados por Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

Se calculó la sensibilidad y el intervalo de confianza del 95% en el programa EPIDAT 3.1 de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

VP= Verdaderos positivos

FN= Falsos negativos

4.9. Especificidad:

Se realizó un ensayo de especificidad utilizando ADN de 10 muestras con otras cepas bacterianas diferentes a *Leptospira* que fueron inoculadas en medio EMJH y suero para detectar falsos positivos, el panel de muestras se describe en la siguiente tabla.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas para la determinación de la especificidad

Cepa	Número de muestras
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Escherichi coli</i>	2
<i>Salmonella spp</i>	2
<i>Proteus spp</i>	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2

Se calculó la especificidad y el correspondiente intervalo de confianza (95%) en el programa EPIDAT 3.1, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad:} \frac{VN}{VN + FP}$$

VN= Verdaderas negativos.

FP= Falso Positivos.

5. RESULTADOS

De los 30 serovares que se sometieron al ensayo se detectaron 15 siendo correspondiente a 12 serogrupos dentro los que se encuentran *pomona*, e *icterohaemorrhagia* dentro las patógenas de importancia así como el serogrupo *patoc* de la saprofitas puesta a prueba. Ver foto 1

La mezcla más adecuada para la PCR resultó ser la número 1 compuesta por Agua free nucleasa 19 µl, Master mix 16 µl, Primer 1 (Lep F1) 2 µl, Primer 2-5 (LepR1) 4 µl, Primer 3 (PU1) 2 µl, Primer4 (SU1) 2 µl y de ADN 5 µl. Ver foto 2

En los ensayos realizados con y sin 5-fluoracilo no se observó diferencia en la capacidad para detectar y diferenciar entre *Leptospira* patógenas y saprofitas. Ver foto 2

La extracción más adecuada resultó ser por calentamiento, en la que se identificaron 8 muestras de 19, mientras que las extracciones con el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®) solo 2 muestras de 8 fueron identificadas. Ver foto 3

En cuanto al límite de detección se encontró que la técnica es capaz de identificar una concentración de 0.012 pg de ADN de *Leptospira* correspondiente a una dilución 1:10000. Ver foto 4

En la determinación de la capacidad de la técnica para detectar e identificar *Leptospira* en muestras de campo se encontró que de 12 muestras de suero se identificaron 3, mientras que de 13 muestras de orina fueron identificadas 5. Ver foto 3

La sensibilidad mostrada fue de 50% IC^{95%} (30.44 – 69.56) mientras que la especificidad fue de 100% IC^{95%} (95 – 100) con un valor predictivo positivos de 100% IC^{95%} (96.67 – 100) y un valor predictivo negativo de 40 IC^{95%} (18.80 – 61.20) esto con una prevalencia de 75% IC^{95%} (60.33 – 89.67) mostrando un Índice de validez de 65.50 % IC^{95%} (46.25 – 78.75).

6. DISCUSIÓN

Actualmente el método para diagnosticar leptospirosis es la prueba de Microaglutinación Microscópica (MAT), pero esta resulta tediosa por la necesidad de mantener las cepas, lo que implica también un riesgo potencial para el personal de laboratorio, además no diferencia entre anticuerpos vacunales y de infección. Otro método directo de diagnóstico es el cultivo pero es limitado y requiere de mucho tiempo (Alonso, et al, 2001).

Debido a las restricciones que generan estas pruebas diagnósticas, se ha estandarizado una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos.

En este estudio se sometieron 30 serovares al ensayo de los que se detectaron 15, correspondiente a 12 serogrupos amplificados, mostrando una sensibilidad del 50%, diferente a los resultados obtenidos por Céspedes et al (2007) en cuyo estudio la PCR pudo amplificar el ADN de 25 serovares de seis especies de *Leptospira* spp. con una sensibilidad del 100% in vitro. Moreno et al (2010) mostró un amplificado específico para 21/22 cepas de referencia con la PCR simple lipL32, mientras que la PCR múltiple secY/flaB amplificó 18/22 cepas.

Esta sensibilidad baja indica que la técnica no es recomendada como una prueba de tamizaje, ya que además del alto costo no es capaz de detectar a toda la población infectada, en cambio la especificidad que se obtuvo fue del 100% demostrada con el uso de ADN de otros agentes patógenos (*Staphylococcus Aureus*, *Escherichi coli*, *Salmonella spp*, *Proteus spp* y *Streptococcus pyogenes*) los cuales no fueron amplificados. Esto coincide con los ensayo realizado por Céspedes et al (2007), Moreno et al (2010), Kositanont et al (2007) y Boonsilp et al (2011) los cuales muestran una especificad del 100% al no obtener amplificado del ADN de otras cepas patógenas que causan enfermedades febriles en sus países. La causa de una especificidad tan alta de la reacción, se debe a las secuencias nucleotídicas específicas formadas por los oligonucleótidos (cebadores): LepF1 (5' GTTACCAAGCACAAGATTAG 3'), LepR1 (5' TAGTCCCGATTACATTTTC 3'),

PU1 (5' TATCAGAGCCTTTTAATGG 3') y SU1 (5' TTTAGGGTTAGCGTGGTA 3'), que fueron diseñados para detectar secuencias nucleotídicas específicas, en este caso el genoma de *Leptospira* spp. (OIE, 2006). También se debe tomar en cuenta que la especificidad de la PCR depende además, de la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción. Cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde; en condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos (McPherson et al, 1991).

En cuanto al límite de detección por la diluciones de ADN puro (120ng) de *L. interrogans* serovar Australis, se obtuvo un producto de 615pb hasta la dilución 1:10000 correspondiente a una concentración de 0.012 pg de ADN de *Leptospira* lo que coincide con la investigación realizada por Moreno et al (2010) cuyo límite de detección de la reacción de la PCR simple lipL32, obtuvo productos específicos de 423 pb *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20 hasta la dilución 1:10000, pero para el caso del límite de detección de la reacción de la PCR múltiple secY/flaB se obtuvieron productos específicos de 285 pb y 793 pb de *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20, hasta la dilución 1:100 para secY y 1:1000 para flaB. Estas diluciones se hicieron a partir de 120 ng de ADN extraído de la cepa de referencia de *Leptospira*.

El límite de detección para la PCR múltiple indica una alta sensibilidad analítica en condiciones de PCR real, esto lo posiciona como un método de diagnóstico molecular de elección para estudios posteriores que busquen validar su uso potencial para el diagnóstico de leptospirosis (Levett et al, 2005).

La técnica fue capaz de identificar *Leptospira* patógena y saprófita, lo que coincide con el estudio de Kositanont et al (2007) que muestran resultados similares, esto se atribuye al uso de los cebadores específicos para la amplificación de genes conservados en cepas patógenas y saprofitas. Otros estudios como los realizados

por Cheema et al., (2007), Moreno et al., (2010) y Rosario et al., (2012) no lograron detectar *Leptospira* saprofitas sólo patógenas, pues en ese estudio se implicó solamente los genes conservados en cepas patógenas de *Leptospira*. La inhabilidad de poder diferenciar entre *Leptospira* patógenas y no patógenas puede ser una dificultad en estudios ambientales donde se quiera diferenciar entre los distintos serovares; sin embargo, no tiene importancia en el aspecto clínico pues no se aísla *Leptospira* saprofitas en muestras animales (Céspedes et al, 2010). Sin embargo otros estudios (Ibáñez et al, 2010)) han mostrado anticuerpos contra *Leptospira* sp., serovariedad *patoc* en 11/59 monos Rhesus (*Macaca mulatta*) en condiciones de cautiverio. Con títulos que variaron de 1:20 a 1:80. Silva et al (2010) recogió muestra de 388 animales (aves, reptiles, mamíferos y peces) tanto salvajes como en cautiverio, resultando positivo a MAT el 26.5% de los animales. Los títulos serológicos predominante fueron de 1:40 y 1:80 para los serotipos *patoc*, *andamana*, *canicola icterohaemorrhagiae* y *panamá*.

La mezcla más adecuada para la PCR resultó estar compuesta por 19 µl de Agua free nucleasa, 16 µl de GoTaq® qPCR Master Mix, 2 µl de cada uno de los iniciadores (Lep F1, Lep R1, PU1, SU1 y Lep R1) a una concentración de 100 [Pmol] y 5 µl de ADN a un volumen final de 50 µl .con una amplificación de 40 ciclos. En una publicación similar realizada por Kosinatont et al (2007) utilizan 5µl de buffer PCR, 8 µl de MgCl₂, 1µl de cada iniciador a 20 [Pmol] y 5 µl de ADN a un volumen final de 50µl. Las condiciones de PCR consistieron de 35 ciclos. Las diferentes concentraciones de reactivos en ambos estudios se deben probablemente a que las condiciones de laboratorio son diferentes en todas las regiones, además del uso en el presente ensayo de un master mix comercial que incluye todos los componentes para la PCR cuantitativa como son: ADN Taq polimerasa, dATP, dGTP, dCTP, dTTP y MgCl₂ a excepción del ADN de la muestra, los cebadores y agua. Utilizar este master mix evita errores en el alineamiento de los cebadores, en la temperatura de disociación de las cadenas tanto del templado como del producto de la PCR, la especificad del producto, la formación de dímero de cebadores y en la inhibición de la Taq polimerasa por altas concentraciones de KCl o NaCl (Martinez et al, 2004).

En cuanto a los ensayos realizados con y sin 5-fluoracilo no se observó diferencia en la capacidad para detectar y diferenciar entre *Leptospira* patógenas y saprófitas. Éste se puso a prueba debido a su utilización en los medios de cultivo cuando se toman muestras en el campo. Su eficacia radica en que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. La timina es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ADN, y su carencia implica que el ADN no se puede replicar, lo que inhibe la división celular (Botana et al, 2002), el 5-fluoracilo no fue una sustancia inhibidora de la PCR pues no provoca el bloqueo directo total o parcial de la actividad catalítica de la ADN polimerasa o inhibe la unión directa al ADN de doble cadena (Newsletter Microbial, 2009).

La extracción de ADN se hizo por calentamiento y con el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®), con el fin de determinar cuál de los métodos era el más efectivo para la extracción resultando ser la extracción por calentamiento, ya que fue capaz de detectar 8 muestras de 19, mientras que con el kit de extracción sólo se lograron identificar 2 de 8 muestras. Aunque con este método además de ser de menor costoso, se obtiene mayores valores de concentración y rendimiento de ADN en el menor tiempo aportándole rapidez y simplicidad a la prueba, la pureza del mismo es baja. La importancia del proceso de purificación del material genético es recobrar el producto máximo de ADN de alto peso molecular libre de proteínas, fenol, e inhibidores de la Taq polimerasa. El ADN de alta calidad es un prerrequisito para su uso en técnicas de biología molecular, en este caso PCR para la identificación de las secuencias específicas de ADN mediante el uso de cebadores, no así el ADN degradado no sustenta la integridad de los sitios blancos para los cebadores y consecuentemente afectar la calidad de la PCR (Rada et al, 1998).

Además de la extracción de ADN por calentamiento existen otras técnicas como son: método fenol-cloroformo, método del acetato de potasio, método del acetato de potasio modificado y método de bromuro de cetil-trimetil amonio, cuya base principal es provocar una lisis celular para inactivar las nucleasas celulares y

separar los ácidos nucleicos de los restos de células (Fraga et al, 2004) (Velasco, 2005).

7. CONCLUSIÓN

- ✓ El PCR multiplex fue capaz de diferenciar entre *Leptospira* saprofitas y patógena.
- ✓ Se obtuvo una baja sensibilidad pero alta especificidad.
- ✓ El 5-fluoracilo no mostró alteración en el proceso de amplificación.
- ✓ La mezcla más adecuada fue la mezcla 1 compuesta por Agua free nucleasa 19 µl, Master mix 16 µl, cebador 1 (Lep F1) 2 µl, cebador 2-5 (LepR1) 4 µl, cebador 3 (PU1) 2 µl, cebador 4 (SU1) 2 µl y de ADN 5 µl.
- ✓ Se obtuvo una alta sensibilidad analítica o límite de detección capaz de detectar hasta 0.012 ng de ADN.
- ✓ El método de extracción más efectivo fue por calentamiento que por el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®).

8. RECOMENDACIONES

- ✓ Validar la técnica con una población más representativa.
- ✓ Publicar los resultados de esta investigación con el fin de seguir mejorando el diagnóstico de leptospirosis por PCR.
- ✓ Promover el uso de la PCR para un diagnóstico rápido de leptospirosis en animales domésticos.
- ✓ Realizar estudios de las fuentes de agua para la caracterización de las zonas de riesgo.
- ✓ Estandarizar técnicas de diagnóstico de campo para fortalecer los sistemas de vigilancia activa.
- ✓ Ofrecer charlas a las poblaciones con mayor prevalencia de leptospirosis, sobre el papel que juegan los animales en la transmisión de la enfermedad.

9. BIBLIOGRAFÍA

Acha P.N., Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. . Washington, D.C: Organización Mundial de la Salud; 1977. Publicación científica: 354.

Acosta H., Moreno C., Viáfara D. Leptospirosis: Revisión de tema. Colombia Med. 1994; 25: 36-42.

Ahmad S. N., Shah S., H. Ahmad F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. J Postgrad Med. 2005; 51:195-200.

Alonso Andicoberry C., García Peña F.J., Ortega Mora L.M. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 2001; 16 (2): 205-225.

André Fontaine G. Canine leptospirosis: Do we have a problem? Vet. Microbiol. 2006; 117(1): 19-24.

Barrero Paola Roxana. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias. Rev. Quím. Viva. 2005; 3(4).

Bharti Ajay R., Nally Jarlath E., Ricaldi Jessica N., Matthias Michael A., Diaz Monica M., Lovett Michael A, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3: 757–771.

Boonsilp Siriphan, Thaipadungpanit Janjira, Amornchai Premjit, Wuthiekanun Vanaporn, Chierakul Wirongrong, Limmathurotsakul Direk, et al. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. BMC Infec. Dis. 2011; 11:338.

Botana L. Luis M., Landoni Fabiana N., Jiménez Tomás Martín. Farmacología y terapéutica veterinaria. 1ra ed. Madrid, España: McGRAW HILL; 2002.

Branger Christine, Blanchard Béatrice, Fillonneau Catherine, Suard Isabelle, Aviat Florence, Chevallier Bruno, et al. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 243(2): 437-445.

Campos C. Viviana. Detección de *Leptospiras* patógenas en tejido renal de perros vagos, mediante PCR en tiempo real [Tesis]. Chillan, Chile: Universidad de Concepción. Facultad de ciencias veterinarias; 2009.

Céspedes Z. Manuel. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2005; 22(4): 290-303.

Céspedes Z. Manuel, Tapia L. Rafael, Balda J. Lourdes, González Q. Dana, Peralta Carlos, Condori Patricia. Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de leptospirosis humana. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2007; 24(1): 20-26.

Céspedes Manuel, Chu Magali, Cano Edith, et al. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en personas asintomáticos y en perros de Chancay, Lima 2001. Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública. 2007; 24 (4): 343-349.

Cheema P.S., Srivastava S.K., Amutha R., Singh S., Singh H., Sandey M. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. Indian Journal of Experimental Biology. 2007; 45: 568-573.

Costa Josep. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(5):299-305.

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infect. Immun. 2005; 73(8): 4853-4863.

Dammert Nicole. Leptospirosis: una revisión bibliográfica. 2005. [Citado 23 de mayo de 2012]. Disponible en: http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/Monografia_leptospira.pdf

Desvars A., Cardinale E., Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol. Infect.* 2008; 139(2): 167–188.

Eribo Broderick, Mingmongkolchai Sirima, Yan Tingfen, Dubbs Padunsri, Nelson Karen E. *Leptospire* Genomic Diversity Revealed by Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization. *Applied and Environm. Microbiol.* 2012; 78(9): 3045–3050

Fraga N. Jorge, Rodriguez Jinnay, Fuentes Omar, Catex Mayda, Fernandez C. Aymé. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Rev cubana med trop* 2004; 56(3):208-13.

Greene C., Sykes J, Brown C., Hartmann K. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. 3a. ed. Buenos Aires, Argentina: Intermédica; 2008.

Hauk P, Macedo F, Romero E. C., Vasconcellos S.A., de Morais Z.M., Barbosa A.S., et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect. Immun.* 2008; 76(6): 2642-2650.

Ibáñez C. A., Hernández G. B., Torres B. J., Meléndez. V. P. Hallazgos de anticuerpos contra *Leptospira sp.*, serovariedades *Panama*, *Lai*, *Australis*, *Shermani* y *Patoc*, en un grupo de monos Rhesus (*Macaca mulatta*) en condiciones de cautiverio. *Arch Med Vet.* 2010; 42:101-104.

Kositanont Uraiwan, Rugsasuk Songsak, Leelaporn Amornrut, Phulsuksombati Duangporn, Tantitanawat Sompong, Naigowit Pimjai. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira spp.* by multiplex polymerase chain reaction. *Diagnosis Microbiology and Infectious Disease.* 2007; 52: 117-122.

La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. News. Microb. 2009; (3): 1-2.

Levett Paul N. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2):296-326.

Levett Paul N., Morey Roger E., Galloway Renee L., Turner Danielle E., Steigerwalt Arnold G., Mayer Leonard W. Detection of pathogenic *Leptospire*s by real-time quantitative PCR. J. Med Microbiol. 2005; 54: 45–49.

Machado Nina Patricia, Téllez Germán Alberto, Cataño Carlos Jonh. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. Infectio 2006; 10(3): 186-197.

Martínez C. Adriana, Silva R. Elsa Patricia. Métodos físico-químicos en biotecnología. PCR. 2004. [Citado 20 de agosto 2013]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

Marshall R.B., Wilton B.E., Robinson A.J. identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. J. Med. Microbiol.1981; 14:163-166.

McDonough P.L. Leptospirosis en caninos - estado actual. En: Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ithaca, New York, USA; International Veterinary Information Service; 200.

McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR: A practical approach. 3ra ed. Oxford, Estados Unidos: University Press;1991.

Méndez A. Sebastián, Pérez R. Eduardo. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22(3):183-92.

Miller Melissa B., Tang Yi-Wei. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 2009; 22(4): 611-627.

Moreno Natali, Agudelo F. Piedad. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira spp.* en Colombia. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2010; 27 (4):548-56.

Morey Roger E., Galloway Renee L., Bragg Sandra L., Steigerwalt Arnold G., Mayer Leonard W., Levett Paul N. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16s rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(10): 3510–3516.

Organización Mundial de Sanidad Animal. Leptospirosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008.

Organización Mundial de la Salud. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro: OMS; 2008. Serie de Manuales Técnicos: 12.

Organización Mundial de Sanidad Animal. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, 2006.

Peláez Sánchez Otto Reinaldo, García Quintero Gustavo, Batista Santiesteban Niurka, Blain Torres Kirenia. Informe del trabajo realizado en el enfrentamiento del brote epidémico de leptospirosis. Managua, Nicaragua: Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de Vacunas. 2007. [Citado 14 de agosto de 2012]. Disponible en:
http://www.conamornicaragua.org.ni/documentos_4/DICIEMBRE/INFORME_BRIGADA_MEDICA_CUBANA_FINAL_IMP

Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J, Leonard. F.C. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 1ra ed. Zaragoza, España: Acribia; 2002.

Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J, Leonard. F.C. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 2 da ed. Zaragoza, España: Acribia; 2005.

Rada T. Ana, Tobaoda L. Gonzalo. Método de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. Biofarbo. 1998; 6: 63-68.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2003; 422(6934):888-893.

Rodicio María del Rosario, Mendoza María del Carmen. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22(4):238-45.

Rodríguez S. Iram Pablo, Barrera S. Hugo A. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 2004; 7(3):323-335.

Rosario Luis A., Arencibia Daniel F., Batista Niurka, et al. Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* por métodos fenotípicos y moleculares en la República de Nicaragua. VacciMonitor. 2012; 21(3):6-12.

Satz Leonardo M., Kornblihtt Alberto R. La reacción en cadena de la polimerasa. Revist. Divulg. Cient. y Tecnol. Asoc.Cien. Hoy. 1993; 4(23).

Silva Carolina dos Santos, Gírio Raul José Silva, Guerra N. Guilherme, Brich Michelle, Santana Lucas Alves de Souza, Amâncio Fábio Henrique, et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil / Anti-*Leptospira* spp. antibodies in wild animals from Ribeirão Preto city zoo in São Paulo State, Brazil. Braz. j. vet. res. anim. sci. 2010; 47(3):237-242.

Terpstra W.J., Korver H., Leeuwen J. van, Kolk A.H.J., Schoone G.J. Alternative methods for the classification of leptospiral serovars. In: The present state of leptospirosis diagnosis and control. Eds.WA Ellis and TWA Little, Publ.Nijhoff, 1986.

Torrez T. Alfredo G., Baca Beatriz Eugenia. Reacción en cadena de la polimerasa. Elementos. 1995; 3(23):16-21.

Velasco M. Reinaldo. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Facult.cienc. agrop.*2005; 3(1): 14-18.

Victoria Berta, Fernández Carmen, Rodríguez José E., Obregón Ana M., Rodríguez Islay. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. *Rev cubana med trop* 2002; 54(1):48-51.

Vital-Brazil Juliana Magalhães, Balassiano Ilana Teruszkin, Oliveira Fabiano Sutter de, Costa Alberto Dias de Souza, Hillen Leandro, Pereira Martha María. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010; 105(3): 353-355.

World Health Organization. Current problems in leptospirosis research. Geneva: WHO; 1967. Technical report series: 380.

Zamora J., Riedmann S. Encuesta Serológica de Leptospirosis Humana en Ocupaciones de alto riesgo en Chile. *Rev. Med. Chile.* 1990; 118: 247-252.

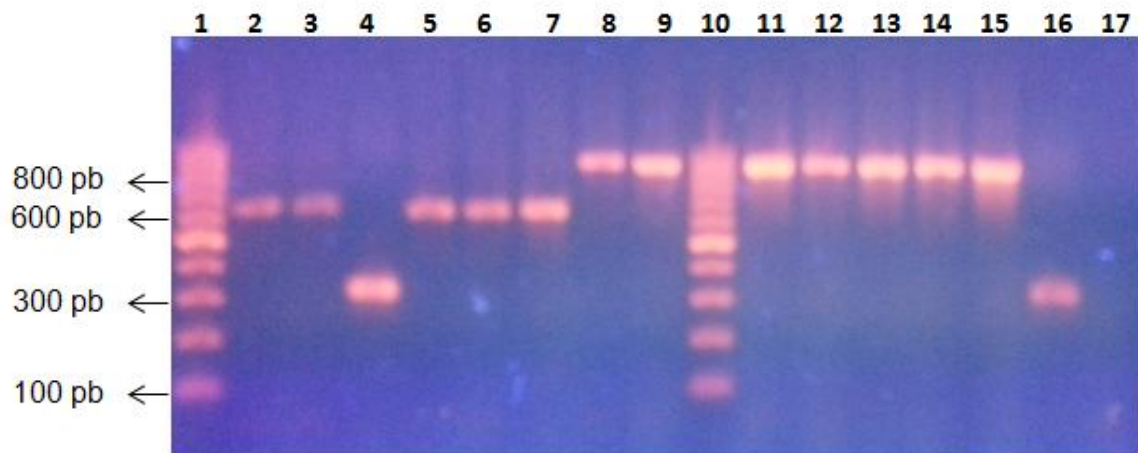
Zunino M. Enna, Pizarro P. Rolando. Leptospirosis: Puesta al día. *Rev. Chil. Infectol.* 2007; 24(3): 220-226.

ANEXOS

Kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®)

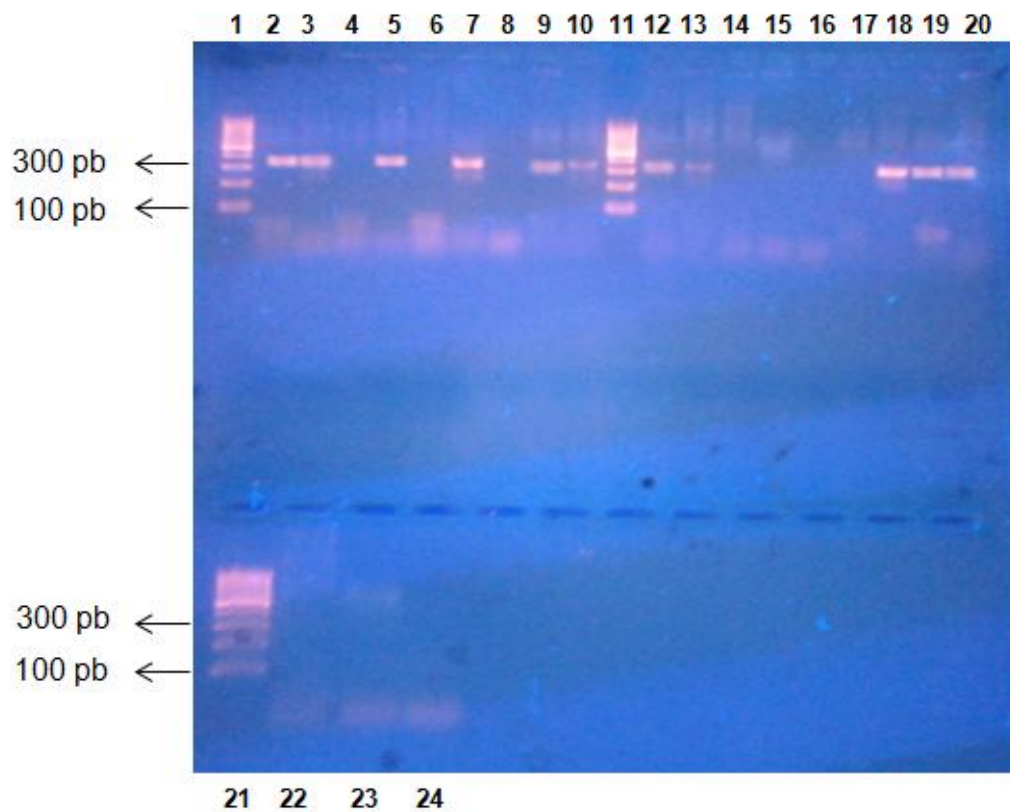
1. 20 µl de proteinasa K en eppendorf.
2. Agregar 200 µl de la muestra.
3. Agregar 200 µl de buffer AL y borteo por 5 segundos.
4. Incubar a 56 °C por 10 minutos.
5. Centrifugar brevemente.
6. Agregar 200 µl de etanol (96 – 100%).
7. Pasar la mezcla del paso 6 y colocarlo en un tubo de ensayo colector, procurando no tocar los bordes y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Cambiar el tubo colector descartando el contenido.
8. Agregar en el centro de la columna 500 µl de buffer AW1. Centrifugar por 8000 rpm por 1 minuto luego descartar tubo colector y el contenido, cambiando a un nuevo tubo colector.
9. Agregar 500 µl de buffer AW2 en el centro de la membrana y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
10. Pasar la columna a eppendorf y centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto.
11. Pasar la columna a eppendorf y agregar 100 µl de buffer AE incubar a temperatura ambiente por 1 minuto luego centrifugar a 8000 rpm por un minuto.

Foto 1



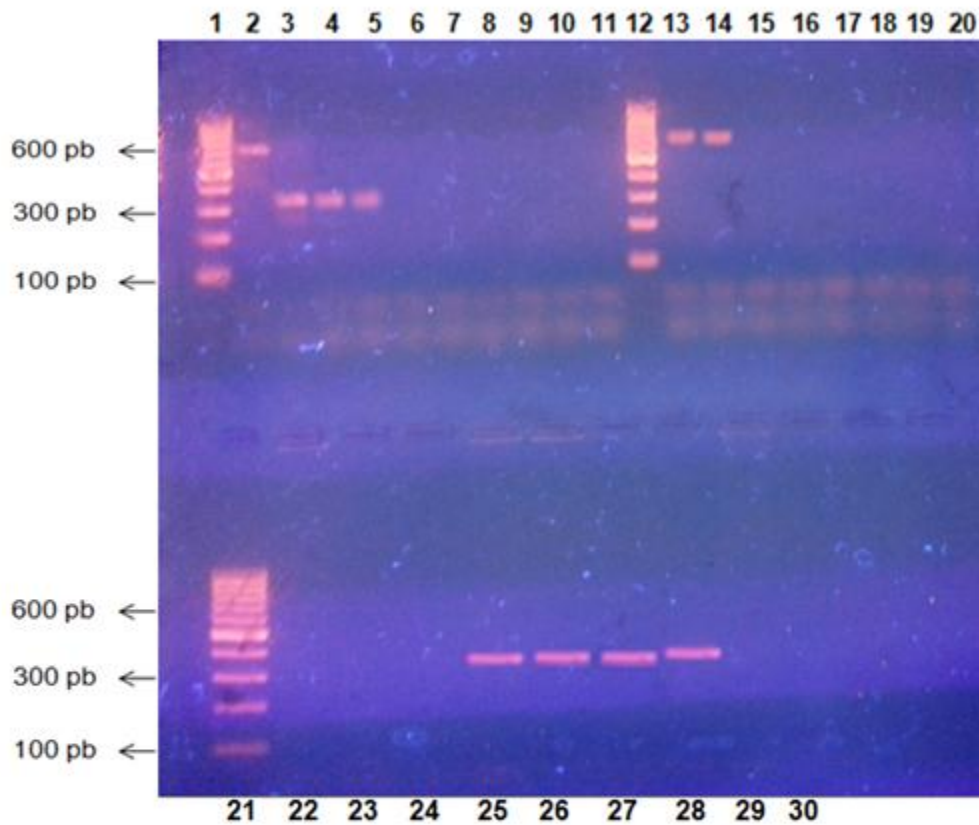
Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de Etidio. Productos de amplificación de 13 serovares. Carril 1 y 10: marcador de peso molecular 100 pb, carril 2 y 3: serovares patógenas, carril 4 y 16: serovares saprófita, carril 5 al 7: serovares patógenas, carril 8 al 15: spp, y carril 17: control negativo de PCR.

Foto 2



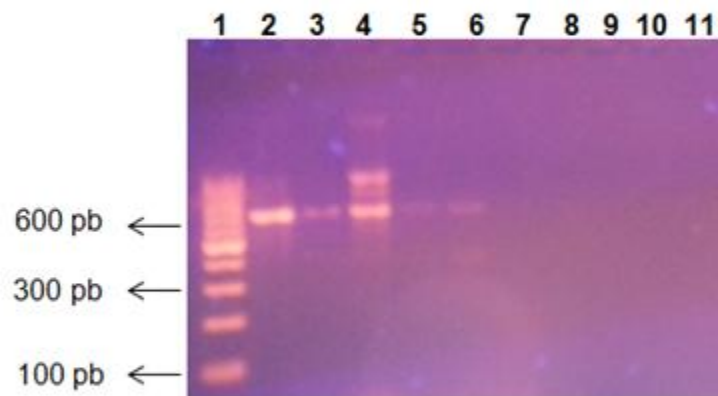
Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de Etidio. Estandarización de multiplex PCR. Carril 1 y 10: marcador de peso molecular 100pb, carril 2 al 8: Mezcla 1, carril 9 al 16: Mezcla 2, carril 17 al 24: Mezcla 3

Foto 3



Gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio. Muestras fingidas de serovares patógenos y saprófita con orina y suero de diferentes animales (equino, porcino, bovino y canino). Carril 1, 12 y 21: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: serovar *Australis* control positivo patógeno, carril 3: serovar *patoc* control positivo saprófita, carril 4, 15 y 28: Orina de porcino, carril 5, 16 y 29: Suero de porcino, carril 6,17, 19 y 24: Orina de equino, carril 7, 18, 20 y 25: Suero de equino, carril 8, 23 y 27: Orina de bovino, carril 9, 22 y 26: Suero de bovino, carril 10, 14 y 30: Orina de canino, carril 11, 13 : Suero de canino

Foto 4



Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de Etidio. Límite de detección de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: control positivo de PCR del serovar *Australis*, Carril 3: dilución 1:10, carril 4: dilución 1:100, carril 5: dilución 1:1000, carril 6: dilución 1:10000, carril 7: dilución 1:100000, carril 8: dilución 1:1000000, carril 9: 1:10000000, carril 10: 1:100000000, carril 11: control negativo de PCR.

Tabla 4. Cepario de referencia de Holanda

Espece	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
<i>L. Interrogans</i>	<i>Australis</i>	<i>Australis</i>	<i>Ballico</i>
	<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Akiyami A</i>
	<i>Betaviae</i>	<i>Betaviae</i>	<i>Swart</i>
	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	<i>Hond Utrecht IV</i>
	<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>
	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>
	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Icterohaemorrhagica</i>	<i>RGA</i>
	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Copenhageni</i>	<i>M20</i>
	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Copenhageni</i>	<i>Wijnberg</i>
	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Kantorowic</i>
	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>
	<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Salinem</i>
	<i>Sejroe</i>	<i>Hardjo</i>	<i>Hardjoprajitho</i>
	<i>Sejroe</i>	<i>Wolffi</i>	<i>3705</i>
<i>L. Noguchi</i>	<i>Australis</i>	<i>Nicaragua</i>	<i>1011</i>
	<i>Lousiana</i>	<i>Lousiana</i>	<i>LSU 1945</i>
	<i>Panama</i>	<i>Panama</i>	<i>CZ 214</i>
<i>L. Biorgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	<i>Castellones</i>	<i>Castellon 3</i>
	<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>	<i>Veldrat Batavia</i>
	<i>Mini</i>	<i>Mini</i>	<i>Sari</i>
	<i>Serjoe</i>	<i>Serjoe</i>	<i>M 84</i>
	<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Pereplitsin</i>
<i>L. welii</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>
	<i>Manhao</i>	<i>Qingshui</i>	<i>L 105</i>
	<i>Sarnin</i>	<i>Sarn 11</i>	<i>Sarnin</i>
<i>L. Kirschneri</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>3522 C</i>
	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Moskva V</i>
<i>L. Neyer</i>	<i>Ranarum</i>	<i>Ranarum</i>	<i>ICF</i>
<i>L. Santarosal</i>	<i>Sherman</i>	<i>Shermani</i>	<i>1342 K</i>
<i>L. Biflexa</i>	<i>Semarang</i>	<i>Patoc</i>	<i>Patoc 1</i>