

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-León

Escuela de Medicina Veterinaria



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

TEMA:

Clasificación molecular de *Leptospira* patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales en Nicaragua en 2012 mediante PCR tiempo real.

Autor:

- **Br. Álvaro José Chávez Silva**

Tutores:

- **Lic. Byron Flores Somarriba MSc.**

“A la libertad por la universidad”

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. Dedicatoria..... | 1 |
| II. Agradecimientos..... | 2 |
| III. Resumen..... | 3 |
| IV. Abreviaturas..... | 4 |
| V. Glosario..... | 5 |
| 1. Introducción..... | 8 |
| 1.1. Antecedentes..... | 11 |
| 1.2. Justificación..... | 14 |
| 1.3. Planteamiento del problema..... | 16 |
| 2. Objetivo general..... | 17 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. Marco teórico..... | 18 |
| 3.1 Características morfológicas del género <i>Leptospira</i> | 19 |
| 3.2 Mecanismo de Transmisión..... | 20 |
| 3.3 Clasificación taxonómica..... | 20 |
| 3.4 Patogénesis..... | 21 |
| 3.5 Manifestaciones clínicas..... | 23 |
| 3.6 Diagnóstico..... | 24 |
| 3.6.1 Cultivo..... | 25 |
| 3.6.2 Métodos fenotípicos (convencionales)..... | 25 |
| 3.6.3 Pruebas serológicas..... | 26 |
| 3.6.4 Métodos Moleculares..... | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa..... | 29 |
| 3.6.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple..... | 30 |
| 3.6.4.3 PCR en tiempo real..... | 30 |
| 4. Diseño Metodológico..... | 34 |
| 5. Resultados..... | 39 |
| 6. Discusión..... | 41 |
| 7. Conclusiones..... | 44 |
| 8. Recomendaciones..... | 45 |
| 9. Bibliografía..... | 46 |
| 10. Anexos..... | 54 |

I. DEDICATORIA

A **Jesús**, mi persona favorita y el mejor de Todos, por cada reto compartido, victorias alcanzadas y derrotas de las que aprendí a su lado.

A **Claudia Silva, Sebastián Chávez**, mi motor y combustible, por su ejemplo de consagración, su vida me enseña algo nuevo cada vez.

A **LACONJE**, por 7 años de verdadera entrega donde me han enseñado a ser mejor cada día. A **J.C** por mucho.

A **Antony Flew**, a quién no conocí, ni me conoció pero me enseñó que para llegar a Dios, además de la Fe, está la razón, y que la ciencia está al servicio de Dios.

II. AGRADECIMIENTOS

A Dios, por quien todo es, de quien venimos y a donde vamos, supremo científico; gracias por el Don de ciencia con que nos bendice para beneficio de su creación.

A mi familia, mi vida no tendría sentido sin ustedes. Cada día a su lado es una aventura. Son la paz en medio de mis batallas.

Al equipo de trabajo del CEVEDI, **Lic. Byron S. Flores MSc.** Mi guía, amigo y tutor por tanta paciencia y animarme a luchar por más.

A **Lic. Brenda Mora MSc.** por su consagrada labor en el mantenimiento de las cepas y aislamientos empleados en este estudio. A **Dra. Christianne Duttmann MSc.** Por su confianza en mí y su cariño materno. **Dra. Eveling Pérez** y **Dr. William Jirón PhD.** Por su apoyo constante, sus consejos e impulsos, su amistad, confianza en mí y ejemplo de trabajo en equipo.

A **Dr. Salvador Contreras**, con mucho cariño y respeto.

III. RESUMEN

Dado el comportamiento endémico y antropozoonótico de la leptospirosis en la región, todos los esfuerzos investigativos deben estar dirigidos para facilitar el diagnóstico temprano de la enfermedad y el conocimiento holístico de su comportamiento epidemiológico mediante qPCR tiempo real. **Objetivo:** Clasificar *Leptospira* patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales mediante qPCR tiempo real. Para tal fin es preciso determinar la sensibilidad y especificidad de qPCR tiempo real mediante la detección del gen *lipL32*. **Diseño:** Las reacciones fueron monitoreadas a través de la fluorescencia de SYBR® green y curva de melting. Se sometieron al ensayo 69 aislamientos, siendo estos de orina de animales domésticos, roedores y aguas ambientales. Para determinar la sensibilidad de la prueba se utilizaron 28 cepas distribuidas en 22 serogrupos de *Leptospira*, 27 correspondientes a cepas patógenas y la cepa Patoc I, representativa de las especies saprófitas. Se sometió la cepa Patoc I a qPCR tiempo real en 10 repeticiones para determinar la especificidad de la prueba. **Resultados:** 14 extracciones de las 27 cepas patógenas mostraron amplificación del producto de 423 bp del gen *lipL32*. La sensibilidad mostrada fue de 51,85% IC_{95%} (31,15 – 72,55) en tanto la especificidad obtenida fue de 100% IC_{95%} (95 – 100). Se obtuvo una amplificación de 7 muestras de los 69 aislamientos de animales domésticos, aguas ambientales y roedores. Se logró la amplificación de las especies *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. meyeri* y *L. noguchii* incluyendo el serovar Nicaragua, cepa 1011, perteneciente a la especie *L. noguchii*. **Conclusión:** Se detectó el gen *lipL32* conservado para especies patógenas en aislamientos a partir de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores, mas los resultados obtenidos no evidenciaron una diferencia significativa entre las frecuencias de los tres tipos de muestras. La sensibilidad de la prueba fue baja, pero la especificidad fue alta.

IV. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosómico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: ARN ribosómico.

bp: Pares de bases.

CNDR: Centro Nacional De Referencia.

Ct: Ciclo umbral, por sus siglas en inglés.

dATP: Trifosfato de desoxiadenosina.

dCTP: Trifosfato de desoxicitidina.

dGTP: Trifosfato de desoxiguanosina.

dTTP: Trifosfato de desoxitimidina.

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harries.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Et al: Derivado de la expresión latín *et alii*, que significa “y otros”.

IC: Intervalo de Confianza.

Ig: Inmunoglobulina.

LCR: Líquido Cefaloraquídeo

MAT: Test de Microaglutinación, del inglés Microagglutination Test

MINSA: Ministerio de Salud.

MLVA: Análisis Multivariante de Locus, por sus siglas en inglés.

NaCl: Cloruro de sodio.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

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

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa, por sus siglas en inglés.

spp: Especies.

Taq: proveniente de *Thermus aquaticus*.

Tm: Temperatura de melting.

5-FU: 5-fluorouracilo.

V. GLOSARIO

ADN Polimerasa: El ADN polimerasa es un conjunto de enzimas que participan en la replicación del ADN. Actúa produciendo dos moléculas idénticas a la molécula de origen.

Amplicones: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un clon molecular.

Amplificación: Aumento del número de copias de una secuencia de ADN, bien mediante un proceso biológico en la célula, o bien mediante técnicas de laboratorio.

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 selectiva.

Antropozoonosis: Enfermedad común a los animales y los humanos.

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

Cepa: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Ct: Ciclo a partir del cual la fluorescencia emitida por el fluorocromo alcanza un nivel umbral. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad específica de ácidos nucleicos en la muestra

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.

Endonucleasa: Grupo de enzimas, cada una de las cuales se une al ADN en una secuencia de bases distinta y produce fragmentos de ADN de distinta longitud.

Hibridación: Es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos anti-paralelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena.

Leptospirosis: La leptospirosis es una enfermedad transmisible de los animales y de los humanos, causada por cualquiera de los miembros patógenos del género *Leptospira*.

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

Nucleósido: El nucleósido es la parte del nucleótido formada únicamente por la base nitrogenada y la pentosa.

Patógena: Agentes tienen el potencial de causar enfermedad en animales y humanos.

Saprófito: Bacterias de vida libre y que generalmente no causan enfermedad.

Serovar: Unidad básica taxonómica que se define sobre la base de similitudes y diferencias antigénicas como las reveladas en la llamada prueba de absorción de aglutinación cruzada.

1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de curso agudo, incluida dentro del grupo de enfermedades antropozoonóticas, de distribución mundial, causada por las bacterias del género *Leptospira* (Levett *et al.*, 2006). Descrita por primera vez por el profesor Adolph Weil, 1886. La enfermedad se mantiene en el ambiente por la presencia de mamíferos portadores con enfermedad renal crónica y en portadores asintomáticos, al ser excretadas a través de la orina.

Es una enfermedad típica de regiones tropicales, cuyos principales hospedadores son los mamíferos incluyendo animales domésticos: bovinos, porcinos, equinos, caninos, ovinos y caprinos. Sin embargo la bacteria también ha sido aislada en reptiles, anfibios, peces, aves e invertebrados. Las infecciones ocurren mayormente en épocas lluviosas. Los huéspedes mamíferos excretan la bacteria en la orina por largos períodos de tiempo; las condiciones óptimas de supervivencia son ambientes cálidos y húmedos, con aguas neutrales a ligeramente alcalinas. (Flannery *et al.*, 2001).

Por sus características las leptospiras son organismos Gram negativos, pero comparten características con las bacterias Gram positivas, son de forma espiral, finas y con capacidad de motilidad, poseen extremos con formas de ganchos y dos flagelos periplásmicos; miden de 6 a 20µm de longitud y aproximadamente 0.1 µm de ancho.

Taxonómicamente se reconocen dos especies de *Leptospira*, *L. interrogans*, comprendiendo las patógenas, y *L. biflexa*, comprendiendo las saprófitas (OMS, 2006). No obstante una nueva clasificación taxonómica desde una perspectiva genotípica a través de estudios de ADN establece *L. biflexa*, *L. meyerii*, *L. wolbachii* como especies saprófitas y *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*,

L. noguchii, *L. santarosai* y *L. weilii* como especies patógenas, distribuidas en 24 serogrupos y 237 serovares (Zunino *et al.*, 2007).

En Nicaragua, octubre de 1995 ocurrió un brote de leptospirosis en Achuapa, municipio de León. Posteriormente la enfermedad se extendió a los departamentos de Chinandega, Chontales, Managua y Estelí. Se reportaron 2,500 casos de leptospirosis y un total de 48 fallecidos. (Solana *et al.*, 2012). Desde entonces la enfermedad continúa comportándose de forma endémica en la región, por lo que investigaciones con enfoques holísticos se requieren para el conocimiento integral de la enfermedad y la toma de decisiones a nivel de salud pública.

Es necesario establecer un diagnóstico diferencial de otras enfermedades de curso febril como el dengue; la clasificación a nivel de serovar implicado en la enfermedad puede ser complicada por las mismas características de la bacteria y su comportamiento epidemiológico. Actualmente se cuenta con un gran número de técnicas para el diagnóstico de *Leptospira*, cuyas muestras pueden ser obtenidas a partir de suero, orina, LCR, leche; de los fetos: muestras de hígado, riñón, pulmones, cerebro y glándula adrenal (Dhaliwal, 1996).

El MAT es la prueba estándar para el diagnóstico de leptospirosis. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de humanos y animales donde el suero reacciona con antígenos vivos de *Leptospira* spp. de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente (Ellis, 1994; Heath y Jhonson, 1994; Dhaliwal, 1996).

En los últimos años la PCR en tiempo real ha emergido como un método ampliamente utilizado en investigaciones biológicas, debido a que puede detectar y cuantificar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos (Valasek y Repa, 2005).

Este método combina la química de la reacción en cadena de la polimerasa tradicional con tecnología fluorescente para la detección de los productos amplificados (Espy *et al.*, 2006).

Uno de los métodos para la detección de ácidos nucleicos con el PCR en tiempo real utiliza el SYBR Green para detectar la acumulación de cualquier producto de ADN de doble cadena (Espy *et al.*, 2006). Este es un agente intercalante fluorescente que se une a los productos de ADN doble cadena de forma sensible, aumentando su capacidad de fluorescencia, al cual es captada por un software (Campos, 2009). Aunque el SYBR Green no es específico, si presenta diversas ventajas en su empleo, como su bajo costo y su alta sensibilidad. (Espy *et al.*, 2006).

Leptospira patógena y saprófita son morfológicamente similares, pero pueden ser diferenciadas, (Johnson y Harris, 1967) basado en sus características moleculares. Esta clasificación es el objetivo de este estudio a fin de conocer las características de los aislamientos obtenidos de las muestras de animales domésticos, roedores y aguas ambientales.

1.1 ANTECEDENTES

1- Levett llevó a cabo la detección de leptospiras patógenas a través de qPCR, utilizó una secuencia blanco de 423 bp para el segmento de ADN que amplifica al gen *lipL32*. Se incluyeron en la prueba 16 serovares representativos de la especie *Leptospira*. Se obtuvieron resultados positivos para todos los serovares patógenos de *Leptospira*, con excepción de *L. fainei*. La especificidad de la prueba fue determinada usando ADN extraído de 47 cepas de 38 especies diferentes de bacterias y hongos, de los cuales ninguno resultó positivo. La sensibilidad fue de 3 copias del genoma por reacción en sangre y aproximadamente 10 equivalentes de genoma por reacción en orina, comparable a un ensayo en tiempo real que utiliza un gen objetivo 16S rRNA (Levett, 2005).

2- Christian A. Ganoza comparó la concentración de leptospiras patógenas en aguas rurales y urbanas en la Amazona del Perú, en la ciudad de Iquitos, en el año 2005. Las muestras de agua fueron analizadas mediante qPCR para la secuenciación del segmento 16S del ARN ribosomal. La concentración de leptospiras patógenas fue mayor en las fuentes de agua urbana que la rural (10^3 leptospiras/ml versus 0.5×10^2 leptospiras/ml); el aislamiento de *L. interrogans* relacionadas con leptospiras en los seres humanos se asoció significativamente con la adquisición urbana (75% de los aislados urbanas) (Ganoza *et al.*, 2006).

3- Campos, en 2009 determinó la prevalencia de *Leptospira* patógenas en 72 perros callejeros, en Chillán, Chile, mediante PCR en tiempo real. Para la amplificación utilizó el gen *lipL32*, presente solo en especies patógenas. Se determinó una prevalencia de 59,7% de perros infectados, y lo contrastó con el 39,1% arrojado por el test de Microaglutinación (MAT), observando una mayor sensibilidad en la prueba de qPCR tiempo real (Campos, 2009).

4- Vital, en mayo 2010 aplicó un protocolo de diagnóstico molecular para la detección de ADN de *Leptospira* spp. en muestras de agua en una zona peri-urbana de Petrópolis, Rio de Janeiro. Se utilizó una multiplex PCR, cebadores LipL32 y 16SrRNA fueron los seleccionados. 3 de las 100 muestras analizadas fueron positivas en la multiplex PCR, 2 de las cuales se consideraron *Leptospira* saprófitas y una de ellas patógena (Vital *et al.*, 2010).

5- Bolívar, en el 2012, determinó la prevalencia de la *Leptospira interrogans* mediante el diagnóstico molecular por PCR, en la población porcina del municipio de Baranoa-Atlántico, Colombia. Para la amplificación por PCR utilizó una secuencia de 331-bp para *Leptospira interrogans*, serovar canícola (16S). De las 337 muestras de orina analizadas, el 34% resultó positiva para *L. interrogans* (Bolívar *et al.*, 2012).

6- En Octubre 2011, Barbagelata aisló *Leptospira borgpetersenii* en fuentes de agua en Argentina, a través de PCR. En la PCR utilizó dos juegos de cebadores G1/G2 y B64-I/B64-II para la detección de *Leptospira* patógena. Sembró 6 muestras de agua de las vertientes, de los cuales obtuvo 5 aislamientos de *Leptospira* spp., de los cuales 2 resultaron positivos a la reacción en cadena de la polimerasa, determinando que se trataba de leptospirosas patógenas. Mediante la genotipificación por MLVA (Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis), se pudo observar que uno de los aislamientos patógenos mostró un patrón correspondiente a la especie *Leptospira borgpetersenii* (Barbagelata *et al.*, 2013).

7- Rosario, en el año 2012, caracterizó 8 aislamientos obtenidos de casos clínicos de leptospirosis a través de métodos fenotípicos y moleculares en León y Chinandega, Nicaragua. Ninguno de los aislamientos mostraron crecimiento a bajas temperaturas (13°C) en medio suplementado con 8-azaguanina (2,25 mg/ml). El método molecular dio como resultado la presencia de bandas de amplificación de los genes *OmpL1* y *lipL32* para los ocho aislamientos (Rosario *et al.*, 2012).

8- Pérez y Salgado, en el 2013, estandarizaron una múltiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos en Nicaragua. De 30 cepas sometidas al ensayo lograron la detección de 15 distribuidas en 12 serogrupos, incluyendo *L. pomona* y *L. icterohaemorrhagiae*, ambas patógenas de gran importancia. La sensibilidad mostrada fue de 50% IC_{95%} (30.44 – 69.56), mientras que la especificidad fue de 100% IC_{95%} (95 – 100) (Pérez y Salgado, 2013).

1.2 JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis al ser una enfermedad zoonótica se vuelve competencia no solo del área de la salud pública, sino también concerniente al ámbito veterinario, que participan directamente en el control y vigilancia de la enfermedad.

El estudio de la leptospirosis, por su amplia distribución, sus numerosos portadores, reservorios inextinguibles, su carácter estacional, sus manifestaciones clínicas variadas y a veces de difícil diferenciación de otros procesos semejantes, exige un estudio holístico de su evolución y comportamiento.

Como parte de su investigación se hace indispensable la determinación de su presencia en animales y fuentes de agua en estrecho contacto con personas, por su potencial transmisión y posterior desarrollo de la enfermedad. Las personas o animales pueden enfermar al ingerir agua contaminada a través de las mucosas, laceradas o no, y a través de la piel macerada o herida, al entrar en contacto con fuentes de agua contaminadas.

Sin embargo la sola identificación por aislamientos positivos de *Leptospira* spp. no es suficiente, hace falta también corroborar que la bacteria presente sea patógena (*L. interrogans*). Se ha desarrollado la PCR en tiempo real, para la detección e identificación de leptospirosis saprofitas en muestras medioambientales, como también leptospirosis patógenas en muestras biológicas como suero, orina y tejido renal (Levett *et al.*, 2005; Merien *et al.*, 2005); constituye una herramienta rápida y confiable para el diagnóstico temprano de *Leptospira* spp. aún en muestras con cantidades bajas de material genético.

El objetivo de esta investigación fue determinar y clasificar *Leptospira* patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales en Nicaragua 2012 mediante PCR tiempo real, y determinar la sensibilidad y

especificidad del qPCR tiempo real para el diagnóstico de *Leptospira* spp. Los resultados se presentan como una herramienta en la toma de decisiones para el control de la enfermedad en futuros brotes epidémicos para su abordaje temprano y oportuno, dirigido a zonas geográficas concretas al conocer la identidad y procedencia de las muestras, así como presentar la qPCR tiempo real como una herramienta oportuna en la vigilancia de la enfermedad.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia de *Leptospira* patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales en Nicaragua en 2012 mediante qPCR tiempo real para la detección del gen *lipL32*?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Clasificar *Leptospira* patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales en Nicaragua 2012 mediante PCR tiempo real.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la sensibilidad y especificidad de qPCR tiempo real, para el diagnóstico de *Leptospira* patógena.
- Detectar el gen *lipL32* en aislamientos de orina de animales domésticos, roedores y aguas ambientales, mediante qPCR en tiempo real.
- Cuantificar el ADN en los aislamientos de orina de animales domésticos, roedores y aguas ambientales, mediante qPCR en tiempo real.

3. MARCO TEÓRICO

La leptospirosis es una importante enfermedad zoonótica de distribución mundial, pero cuya prevalencia es mayor en regiones tropicales y subtropicales, causada por cualquiera de los miembros patógenos del género *Leptospira*. Con varias especies animales actuando como portadoras. Es considerada como un problema emergente global de la salud pública. (Bharti *et al.*, 2003; OIE, 2008). La leptospirosis está agrupada dentro del grupo de las enfermedades febriles hemorrágicas, aunque suele cursar con una amplia variedad de síntomas.

La infección en humanos es a través del contacto directo e indirecto con leptospiras presentes en la orina de animales infectados (Levett, 2001) y la severidad de la enfermedad dependerá del serovar, abarcando desde una infección asintomática a una enfermedad fatal, con compromiso de riñón, hígado u otros órganos vitales (Brown y Prescott, 2008).

Las leptospiras son bacterias del género *Leptospira* spp, junto con los géneros *Leptonema* y *Turneriella*, es miembro de la familia Leptospiraceae. Pertenece al orden de los Spirochaetales. Por sus determinantes antigénicos, el género *Leptospira* está constituido por dos especies: *L. biflexa* y *L. interrogans* (*sensu lato*). *L. biflexa* es una espiroqueta saprófita de vida libre sin capacidad patogénica (Céspedes, 2005; Quinn *et al.*, 2002).

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).

En los últimos años la clasificación molecular ha sido utilizada para dividir el género *Leptospira* en varias especies en base a su ADN, clasificación que entrega valiosa

información taxonómica, pero es independiente de la clasificación serológica con que los epidemiólogos y clínicos están más relacionados (Bharti *et al.*, 2003).

3.1 Características morfológicas del género *Leptospira*

Son bacterias Gram negativas dado que poseen en una membrana citoplasmática y otra externa, aunque comparten características con las bacterias Gram positivas, sin embargo no se tiñen adecuadamente a través de los colorantes convencionales, su observación en los microscopios es verdaderamente difícil, por lo que habitualmente se visualizan por medio de la microscopía de campo oscuro. Para poder demostrar su presencia en tejidos se hace uso de la impregnación argéntica y las técnicas de inmunohistoquímicas (Quinn *et al.*, 2002).

Su tamaño usualmente es de 0,25 por 6-25 μm , poseen forma cilíndrica y helicoidal, con dos filamentos axiales insertados en los extremos del cuerpo celular, que actúan como citoesqueleto y le permiten el movimiento. Los dos flagelos de la *Leptospira* se extienden desde la membrana citoplasmática en los extremos de la bacteria, y a través del espacio periplásmico y son necesarias para la motilidad del microorganismo (Bharti *et al.*, 2003; Picardeau *et al.*, 2001); estas características morfológicas le entregan a estos microorganismos la capacidad de excavar en el interior de tejidos (Langston y Heuter, 2003).

Se han descrito tres tipos de movimientos: rotación alrededor de su eje central, movimientos progresivos rectos y movimientos circulares (Bharti *et al.*, 2003); según su respiración son aerobios obligados; 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 sobrevivencia depende directamente del medio en el que se encuentra, son sensibles a la desecación, los cambios de pH, pH<6 y pH>8 son inhibidores; temperaturas < 7 - 10°C (44.6 - 50°F) y temperaturas > 34 - 36°C (93 - 96°F) son

nocivas, también son sensibles a la hipersalinidad, la luz solar directa, desinfectantes comunes, detergentes y jabón (McDonough, 2001; Zamora y Riedemann, 1999).

3.2 Mecanismo de Transmisión

Los animales pueden aparecer como portadores inaparentes o asintomáticos y eliminar las leptospiras en la orina, sirviendo por lo tanto como reservorios temporales o permanentes y una fuente de infección para otros animales o personas (Lilenbaum *et al.*, 2009; Adler y de la Peña 2010). La eliminación de las leptospiras se considera intermitente, y cada serovar posee uno o más huéspedes con diferentes niveles de adaptación (Subharat *et al.*, 2011; Fornazari *et al.*, 2012; Hamond *et al.*, 2012).

La bacteria se transmite por contacto directo o indirecto. La transmisión directa se da a través de orina infectada, transmisión venérea o transplacentaria, heridas por mordedura o ingestión de tejidos infectados. La transmisión indirecta se da a través de la exposición del animal o persona susceptible al 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).

En este contexto cabe destacar la importancia que tienen los roedores como fuente infecciosa, puesto que muestran una marcada resistencia al desarrollo de la enfermedad y diseminan la leptospiras por meses o años (Athanzio *et al.*, 2008).

3.3 Clasificación taxonómica

El género *Leptospira* pertenece a la familia Leptospiraceae y al orden Spirochaetales. Tradicionalmente han sido clasificadas tomando como base a sus determinantes antigénicos en dos especies, la mayoría de leptospiras patógenas se agruparon dentro de la especie *L. interrogans sensu lato*, las otras se pusieron en la especie *L. biflexa sensu lato* que agrupa a las saprofitas principalmente (Céspedes, 2005).

La unidad taxonómica en *Leptospira* es el serovar, ambas especies (*L. interrogans* y *L. biflexa*) han sido dividido en numerosos serovares por la prueba de aglutinación cruzada (CAAT), muchos serovares dentro de un serogrupo son representados por una sola cepa de referencia (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003). Los serovares homólogos antigénicamente han sido agrupados en serogrupos. Existe más de 60 serovares de *L. biflexa sensu lato* y más de 240 serovares agrupados en 24 serogrupos dentro de *L. interrogans*.

Actualmente, la clasificación del género *Leptospira* está basado en la homología en su ADN y está dividido en 17 especies; definido en 70% de homología y 5% de divergencia en el ADN (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 1999); el avance en la biología molecular ha permitido también secuenciar su genoma que consiste en dos cromosomas circulares (Nascimento *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2003).

Sin embargo, tal clasificación es utilizada junto con la clasificación serológica antigua según la necesidad, siendo de mayor importancia clínica la clasificación antigénica; debido a problemas en la clasificación los nuevos aislamientos de *Leptospira* deben caracterizarse por pruebas moleculares y serológicas (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001).

3.4 Patogénesis

El periodo de incubación es de 7 a 26 días, con un promedio de 12 días. La bacteria penetra a través de la piel macerada por el agua, por excoriaciones en la piel o por

mucosas intactas o no, y alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, diseminándose a todos los órganos, incluso líquido cefalorraquídeo (LCR) y humor acuoso; sus movimientos típicos y la producción de hialuronidasa, explican la penetración a estos sitios (Lee *et al.*, 2000; Hauk *et al.*, 2005).

La leptospirosis puede tener diferentes manifestaciones, grados o intensidades 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, dependiendo esencialmente de la cepa involucrada y la susceptibilidad del hospedador (Zunino y Pizarro, 2007).

En la primera semana, las leptospiras se pueden encontrar en sangre y LCR, sin ocasionar síntomas neurológicos. Los órganos más frecuentemente afectados incluyen al hígado, riñón, cerebro y músculos. Dentro de las complicaciones está la disfunción hepática que se manifiesta por la disminución de la excreción de la bilirrubina como alteración más frecuente, disminución de los niveles de albúmina sérica, incremento de los niveles de inmunoglobulinas y disminución en la producción de los factores dependientes de la vitamina K (Faine *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003; Lux *et al.*, 2000).

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, hemorragia, edema, diátesis hemorrágica y potencialmente coagulación intravascular diseminada (Quinn *et al.*, 2002).

La insuficiencia renal aguda por necrosis tubular aguda, es causada por efecto directo de las leptospiras sobre el tejido renal, la hipoxia o el depósito de complejos antígeno-anticuerpo-complemento en los glomérulos. La afección vascular, se debe a vasculitis grave con daño endotelial, produciendo lesión en los capilares (Céspedes, 2005).

La nefritis intersticial es estimulada por una lipoproteína de membrana externa denominada LipL32, la cual induce una respuesta inflamatoria a través de la liberación de sustancias quimiotácticas que indirectamente contribuyen al daño tisular (Yang *et al.*, 2002).

3.5 Manifestaciones clínicas

La expresión clínica de la infección por *Leptospira* varía en el ser humano ampliamente desde procesos asintomáticos, pasando por las formas de evolución generalmente benignas, hasta el desarrollo de cuadros graves icterohemorrágicos con colapso vascular y fallo en la función hepática y renal, que puede ser de evolución fatal (Céspedes, 2005).

Los signos clínicos en la leptospirosis son muy parecidos en todas las especies animales, salvo por la especie de *Leptospira interrogans*, serovariedad *icterohaemorrhagiae* que produce septicemia grave. Además, algunos serotipos tienen capacidad de producir hemólisis.

A nivel reproductivo la leptospirosis puede causar abortos o muerte perinatal, pero debe ser considerada como diagnóstico diferencial, estas manifestaciones pueden ocurrir posterior a una infección (André Fontaine, 2006).

Las manifestaciones oculares incluyen extravasación conjuntival, 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).

En los bovinos son más susceptibles a contraer la enfermedad los terneros de un mes o menos, 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.

Como consecuencia de la anemia se produce un aumento de la frecuencia cardíaca y de la intensidad de los ruidos cardíacos.

En la forma subaguda se presentan los mismos síntomas, la fiebre es de 39 a 40 C°, y los signos guardan relación con la ubre y su nivel de producción, la cual disminuye, y el color de la leche se torna amarillento o rojizo. En la forma crónica, los signos destacados son reabsorción embrionaria o momificación, mortinatos y 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).

3.6 Diagnóstico

Debido a sus características protéicas, la leptospirosis mimetiza muchas otras enfermedades y por ende dificulta el diagnóstico clínico. El apoyo de laboratorios especializados para establecer el diagnóstico es por lo tanto indispensable; cabe resaltar la necesidad de un personal capacitado para el manejo del material biológico, por riesgos de contaminación (Terpstra, 1992).

El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo mediante el aislamiento de la bacteria y su observación en microscopía de campo oscuro, la presencia de anticuerpos antileptospira en el suero de los animales y el diagnóstico molecular a través de PCR, sea a través de PCR convencional o qPCR tiempo real, (Pérez,

2013). Sin embargo, existen cada día nuevos métodos diagnóstico serológico y molecular con resultados más fiables y rápidos disponibles.

3.6.1 Cultivo

La *Leptospira* spp. 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- Fluorouracilo (Pérez y Salgado, 2013).

Las cepas se cultivan en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (pH 7,8) a 28 °C y se conservan en medio semisólido Fletcher a una temperatura entre 28-30 °C. Se mantienen mediante cultivos semanales en el medio proteico EMJH, bajo condiciones estáticas a 28-30 °C (Adler & de la Peña, 2010). Los aislamientos se observan semanalmente a través de microscopia de campo oscuro.

3.6.2 Métodos fenotípicos (convencionales)

3.6.2.1 Crecimiento a 13°C

Se inoculara 0,1 mL de medio de cultivo, proveniente de un cultivo estático de 5-7 días en el medio proteico EMJH, a una concentración ajustada de $7,5 \times 10^6$ células/mL (conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser) con las cepas utilizadas en 10 mL de medio fresco y luego se incuban a una temperatura de 13 °C (Terpstra, 2006). Se verifica el crecimiento a los 7, 14, 21 y 30 días postinoculación mediante la observación en microscopio de campo oscuro (Rosario *et al.*, 2012).

Las cepas patógenas para mantener su crecimiento y antigenicidad necesitan crecer en medios de cultivos adecuados a temperatura de 28-30 °C. Las cepas

saprófitas aisladas de aguas estancadas y suelo encuentran más favorable el crecimiento a estas bajas temperaturas.

3.6.2.2 Prueba de 8-azaguanina

Para la realización de esta prueba se prepara una suspensión de 8-azaguanina a una concentración de 2,25 mg/mL con agua destilada (Terpstra, 2006). Luego se diluye la suspensión con un agitador magnético y se esteriliza el frasco que contiene la suspensión de 8-azaguanina durante 20 min a 121 °C. Se toma 1 mL estéril de esta suspensión y se mezcla de forma mecánica con 9 mL en medio EMJH fresco (Rosario *et al*, 2012).

Las diferencias entre patógenas y saprófitas es justamente la inhibición del crecimiento de las primeras en un medio de cultivo selectivo rico en 8-azaguanina, pues no tienen la capacidad de incorporar bases de pirimidina exógenas en sus ácidos nucleicos (Terpstra, 2006; Ristow *et al.*, 2008). En este medio las leptospiras saprófitas crecen bien, en tanto las patógenas cesan su crecimiento después de 1-2 generaciones (Terpstra, 2006; Ristow *et al.*, 2008).

3.6.2.3 Conversión a formas esféricas

A causa de la alta sensibilidad y conformación elástica de la membrana citoplasmática de las cepas patógenas de *Leptospira*, estas adoptan una forma esférica ante la introducción de una suspensión de NaCl (1M), lo que conduce a que se observen como pequeñas bolitas de forma brillante en el microscopio de campo oscuro (Terpstra, 2006).

3.6.3 Pruebas serológicas

Debido a los altos costos de las pruebas moleculares, las pruebas serológicas son los procedimientos de laboratorio más utilizados para la confirmación del diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el rebaño y para realizar los

estudios epidemiológicos. Los anticuerpos antileptospira son detectables 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 descendan 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 (Pérez y Salgado, 2013).

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).

3.6.3.1 Test de Microaglutinación

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).

Su principio básico consiste en el contraste de sueros de pacientes sospechosos con los serovares mantenidos en el laboratorio, de existir anticuerpos antileptospira en los sueros, existirá una aglutinación microscópica, observable a través del microscopio de campo oscuro, basado en una titulación específica o punto de corte.

El laboratorio en que se realice el MAT debe contar 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). 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).

3.6.3.2 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima - ELISA

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). 1 semana después de la infección este ensayo es capaz de detectar IgM antileptospira, antes de que estén presentes los anticuerpos aglutinantes. Los anticuerpos IgG se detectan a partir de la 2 semanas después de la infección, y persisten durante largos periodos de tiempo (OIE, 2008). Esto proporciona una ventaja ineludible de rapidez comparado a métodos diagnósticos como el aislamiento.

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 (Winslow, 1997). Los anticuerpos IgM han sido detectados por ELISA en LCR en 15% de pacientes con meningitis sin una etiología probada (Silva *et al.*, 1996). También las IgM se han detectado en la saliva (da Silva *et al.*, 1992).

3.6.4 Métodos Moleculares

La biología molecular ha venido a innovar los métodos para el diagnóstico temprano de la leptospirosis, este se basa en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospiras en muestras clínicas. Los métodos moleculares, tales como la hibridación, PCR (PCR convencional o qPCR tiempo real) y Southern blot que emplean secuencias específicas del ADN bacteriano, han permitido la identificación de especies de *Leptospira* patógenas y no patógenas. La PCR aplicada a *Leptospira* se ha estudiado con el fin de diferenciar cepas patógenas de saprófitas (Hernández *et al.*, 2011). A diferencia de otros métodos, las técnicas moleculares reflejan la presencia actual del agente en la muestra del animal para fines clínicos.

3.6.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que una secuencia blanco de éste es amplificado mediante la alineación de una secuencia nucleotídica o cebadores, y la posterior incorporación de nucleótidos complementarios, por parte de la enzima *Taq* polimerasa, con lo que se da origen a una nueva hebra de ADN de la zona a amplificar (Satz y Kornblihtt, 2003; Valasek y Repa, 2005; Wilson y Walker, 2005; Pérez y Salgado, 2013). Su amplificación 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 (Pérez y Salgado, 2013)

De forma resumida el proceso puede explicarse como la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas por un tiempo determinado. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. En el primer paso la extracción de ADN se calienta hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, a esto se le conoce como desnaturalización (Satz *et al*, 1993). En el segundo paso se da la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores, a una temperatura que facilita la unión de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs (Rodríguez *et al*, 2004). Por último se da la 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).

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

Para determinar si una cepa es patógena o no se utilizan dos formas de PCR cuya diferencia estriba fundamentalmente en el cebador que se emplea (Gravekamp *et al.*, 1993). En este sentido algunos investigadores establecen el uso de un cebador del 16S o 23S ARNs ribosomal y otros utilizan cebadores de genes que se obtienen a partir de proteínas bien conservadas en las especies de *Leptospira* patógenas, las cuales le confieren patogenicidad a este microorganismo (Gravekamp *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2011).

3.6.4.2 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 (Méndez *et al.*, 2004).

3.6.4.3 PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica basada en el método de PCR, desarrollado por Kary Mullis en los años 80, el cual permitía a los investigadores amplificar segmentos específicos de ADN millones de veces (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987; Mullis *et al.*, 1990). Higuchi y colaboradores lograron la primera demostración de PCR en tiempo real al grabar la acumulación de ADN, a través del incremento de la fluorescencia del Bromuro de Etidio cuando este se une a secuencias de ácidos nucleicos (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). La técnica de PCR en tiempo real nació al combinarse la química de esta reacción con PCR y videografía en tiempo real.

El objetivo fundamental de la PCR en tiempo real es distinguir de forma precisa y medir ácidos nucleicos específicos en una muestra, incluso si solo hay una pequeña cantidad de la misma. La PCR en tiempo real amplifica una secuencia blanco específica en una muestra, luego monitorea el proceso de amplificación usando tecnología fluorescente. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal de

fluorescencia llega al nivel de umbral se correlaciona con la cantidad original de secuencia blanco presente en la muestra, permitiendo así la cuantificación. Adicionalmente, el producto final puede ser clasificado al someterlo a temperaturas crecientes para determinar a cual temperatura los productos de doble cadena se disocian. Este punto de fusión es una característica dependiente del largo de los amplicones, la cantidad de GC y la secuencia entre los mismo (Valasek & Repa, 2005).

La PCR aprovecha la reacción de las polimerasas para amplificar secuencias cortas de oligonucleótidos específicos añadidos a la reacción para actuar como cebadores. La primera y más utilizada de estas enzimas es la *Taq* ADN polimerasa (proveniente de *Thermus aquaticus*), su amplia utilidad muchas veces se relaciona con su resistencia a altas temperaturas, lo cual es justificable porque después de cada ronda del ciclo, la doble cadena resultante debe ser separada en cadenas sencillas a altas temperaturas en el tubo (95°C) (Valasek & Repa, 2005).

La reacción luego es enfriada para permitir a los cebadores unirse al templado de ADN de cadena sencilla y permitir a la enzima ADN polimerasa la elongación al añadir nucleótidos individuales de forma complementaria para generar una nueva cadena doble de ADN. Luego esta doble cadena de ADN debe ser separada otra vez para el siguiente ciclo. Así, si la reacción funciona con perfecta eficacia, habrá el doble de moléculas de ADN doble cadena al final de cada ciclo de PCR. En la realidad la reacción no mantiene una eficiencia perfecta porque los reactivos del PCR son consumidos después de varios ciclos, con lo cual la reacción va llegando a una fase de meseta. (Valasek & Repa, 2005).

SYBR® Green

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. Este sistema cuenta con la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es fácil y además, es de un costo

menor que las sondas específicas. El principal inconveniente que presenta, es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR (Costa, 2004).

Para incrementar su especificidad se recomienda seleccionar cuidadosamente los cebadores y evitar utilizar concentraciones demasiado altas. El manejo de las temperaturas de alineamiento y el empleo de polimerasas termorresistentes, son de gran ayuda. A esto se suma el análisis de la curva de disociación de los productos amplificados, para determinar el pico de la curva de *melting* o *Tm* (Valasek y Repa, 2005).

La *Tm* es la temperatura en la cual el 50% de la hebra de ADN se encuentra desnaturalizada (Espy *et al.*, 2006), y es considerada una propiedad dependiente de la longitud del producto y de su composición nucleotídica, que permite discriminar el producto final y ayudar de esta manera a incrementar la especificidad de la técnica (Valasek y Repa, 2005).

Entre las ventajas de la PCR en tiempo real destaca: su sensibilidad, la rapidez, la disminución del riesgo de contaminación y la posibilidad de rentabilizar al máximo los equipos, permitiendo un mayor flujo de ensayos. Estos sistemas permiten cuantificar la concentración inicial de ácidos nucleicos presente en las muestras, asimismo es posible determinar mutaciones puntuales (Costa, 2004).

En la actualidad se ha desarrollado PCR en tiempo real, para la detección e identificación de leptospiras saprofitas en muestras medioambientales, como también leptospiras patógenas en muestras biológicas como suero, orina y tejido renal (Levett *et al.* 2005; Merien *et al.*, 2005).

lipL32

La envoltura celular de las leptospiros es inusual entre las bacterias, compartiendo características tanto de Gram negativas como Gram positivas. La membrana externa contiene lipopolisacáridos; en este aspecto son similares a las *Brachyspira*, pero diferente a *Borrelia* y *Treponema*. Parecida a *Borrelia* la membrana externa de *Leptospira* tiene una gran proporción de lipoproteínas expuestas en la superficie. La más abundante de estas lipoproteínas es LipL32. (Murray, 2013)

LipL32 es una proteína de 272 aminoácidos, y es considerada la proteína más abundante entre las leptospiros, con un aproximado de 38,000 copias por célula (Malmstrom *et al.*, 2009). También es un importante inmunógeno en el desarrollo de la leptospirosis humana. La secuencia y expresión de LipL32 está altamente conservada entre especies patógenas de *Leptospira*. Estos hechos ponen de manifiesto que LipL32 puede ser un antígeno importante en la patogénesis, diagnóstico y prevención de la leptospirosis (Haake *et al.*, 2000).

La utilización de LipL32 para fines diagnósticos, comenzó el año 2005, cuando un grupo de investigadores, diseñó partidores para su detección por PCR convencional, en muestras de sangre, de aquel ensayo se pudo reconocer como positivas todas las especies patógenas de *Leptospira*. Los resultados de las especies saprófitas y otras bacterias presentes en las muestras, resultaron negativas (Branger *et al.*, 2005). Ese mismo año, se sintetizaron cebadores para la detección de LipL32 mediante PCR en tiempo real con SYBR green, en muestras de suero y orina de pacientes con leptospirosis confirmada mediante serología, sus resultados permitieron la detección de diferentes especies de leptospiros patógenas (Levett *et al.*, 2005).

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio: Descriptivo de tipo transversal.

4.2.1 Área de estudio.

Correspondió a las viviendas de pacientes confirmados reactivos reportados por el MINSA (Ministerio de Salud) en zonas urbanas y rurales de los departamentos de Chinandega, Estelí, Jinotega, León, Managua y Rivas en el 2012.

Las precipitaciones en Nicaragua varían de menos de 800 mm en las zonas más secas a 5000 mm y más en la zona más húmeda. Estas precipitaciones se registran en cualquier mes del año, pero la mayor cantidad cae entre mayo y noviembre. En la región del Pacífico y en gran parte de la región Norte y Central, existen dos estaciones bien marcadas: la estación lluviosa que se extiende de mayo a octubre y la estación seca de noviembre a abril.

El clima suele ser muy seco, con poca lluvia, y temperaturas que oscilan entre los 27 °C y 32 °C en invierno y los 35 °C y 40 °C durante el verano. En la Región del Pacífico y en la cuenca de los lagos (Cocibolca y Xolotlán), predominan los días muy cálidos, caracterizados por temperaturas medias superiores a 34.0 °C. En las regiones montañosas más elevadas, por encima de los 800 msnm, prevalecen los días confortables casi todo el año, debido a la ocurrencia de temperaturas medias inferiores a 26.0 °C y en algunos puntos menores de 20.0 °C. La temperatura media del país es de 25.4 °C.

4.2.2 Población de estudio

Todos los aislamientos realizados en el laboratorio de leptospirosis de la Escuela de Medicina Veterinaria, UNAN-León, obtenidos a partir de animales domésticos,

roedores y fuente de aguas de las viviendas con casos positivos a leptospirosis humana, reportados por el Ministerio de Salud (MINSA) en el año 2012.

4.2.3 Tamaño de la muestra

Se tomaron las muestras con aislamientos positivos de 25 animales domésticos de las especies bovinos, caninos y porcinos; 24 crecimientos a partir de roedores y 20 a partir de muestras de agua para un total de 69 muestras.

4.2.4 Selección de la muestra

El método por el cual fueron seleccionadas las muestras fue por conveniencia, en base a los aislamientos encontrados en mejores condiciones de crecimiento, es decir mayor cantidad de espiroquetas por campo y menor cantidad de organismos contaminantes en el medio.

4.2.5 Factores de inclusión: Los aislamientos de 7 días de crecimiento en caldo EMJH con más de 200 espiroquetas por campo y con poca presencia de organismos contaminantes.

4.2.6 Toma y envío de las muestras.

Se tomaron orina de animales domésticos incluyendo caninos, porcinos y bovinos que habitaban en la casa del caso humano reactor a *Leptospira* o en radio de 100 m².

Las muestras de orina fueron recolectadas por punción directa a la vejiga o por micción (natural o estimulada), según conveniencia; seguidamente se colocaban de 3-5 gotas de orina medio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris)-5 FU (Fluorouracilo) y mantenidos a temperatura ambiente.

Los roedores fueron capturados utilizando trampas de Sherman® para captura viva, colocadas por la tarde y retiradas a la mañana siguiente por dos días consecutivos.

Las muestras de aguas ambientales, se tomaron superficialmente y bajo sombra, posteriormente inoculadas en los tubos con EMJH-5FU, colocando de 3-5 gotas y transportadas a temperatura ambiente.

4.3 Recolección de datos

Se realizó recolección de datos de fuentes primarias, cumplimentando una ficha de recolección de datos a través de observación directa y entrevistas a los habitantes en el momento de recolección de la muestra; los datos incluyeron aspectos generales y epidemiológicos que podrían mostrar asociación con la aparición de casos de leptospirosis humana.

4.4 Análisis de las muestras

4.4.1 Cepas de *Leptospira*: En este estudio se emplearon 28 cepas distribuidas en 22 serogrupos de *Leptospira*, proporcionados por Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

4.4.2 Aislamientos: Las condiciones de crecimiento de los aislamientos fueron de 28-30°C en medio EMJH 5FU para su mantenimiento. Los inóculos fueron observadas por microscopía de campo oscuro semanalmente hasta observar crecimiento de espiroquetas o se descartaron a los 13 meses en caso contrario.

En caso de roedores en el laboratorio, se les aplicó eutanasia por medio de cloroformo y se tomaron muestras de riñón, hígado y fetos por disección en una campana de bioseguridad. Las muestras se inocularon en medio EMJH 5FU para su mantenimiento y procesadas semejante a las muestras de orina y aguas.

Los aislamientos positivos fueron inoculados en medio Fletcher para su conservación y posterior reactivación.

4.4.3 Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN a partir de crecimientos de espiroquetas con 200 o más células por campo, posterior a la reactivación, para lo que se empleó el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®) siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes. Se ensayaron extracciones por calentamiento a 90°C – 100°C por 20 minutos. El ADN extraído se almacenó a -20° C hasta su amplificación.

4.4.4 Cebadores:

Se utilizaron los iniciadores descritos por Levett 2005; LipL32-270F (59-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-39) LipL32-692R (59-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-39) que amplifican una región de 423 pb del gen *lipL32* presente únicamente en las especies patógenas del género *Leptospira*. La temperatura de melting esperada fue de 82.5°C a 83.5 °C.

4.4.5 Condiciones para qPCR en tiempo real con SYBR Green.

Las reacciones fueron realizadas agregando 19 µl de GoTaq® qPCR Master Mix, hot-start de PROMEGA, USA; más 1 µl de ADN extraído.

La amplificación se realizó en el termociclador Mini-Opticum®, bajo las siguientes condiciones de temperaturas; **1.** 95.0°C por 7:00 min; **2.** 55.0°C por 15 seg; **3.** 72.0°C por 15 seg; **4.** 79.0°C por 5 seg; Lectura; **5.** 94.0°C por 15 seg; **6.** Regresar al paso 2, 44 veces; **7.** 94.0°C por 10 seg; **8.** Curva de melting; de 65,0°C a 95,0°C, incrementando 0.5°C cada 5 seg; Lectura; **9.** 4,0°C por ∞. **Ver gráfica 6**

4.4.6 qPCR

a. Control positivo: Se sometieron 27 cepas de referencias, de las especies patógenas y de patogenicidad intermedia.

b. Control negativo: Se utilizó la cepa de referencia Patoc I, serovar Patoc, Serogrupo Semaranga, especie *L. biflexa*, de la especie de *L. biflexa* en 10 repeticiones, además de agua libre de nucleasas.

c. Muestras: Se utilizaron 69 aislamientos de orina de animales domésticos, roedores y aguas ambientales.

4.5 Análisis de datos:

Se calcularon los estadísticos para pruebas diagnósticas simples tales como la sensibilidad y especificidad, además de la estadística inferencial para proporciones en una población en los aislamientos a partir de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales. Los análisis fueron realizados en el programa para análisis epidemiológicos de datos tabulados EPIDAT 3.1.

5. RESULTADOS.

Para las pruebas de sensibilidad y especificidad se sometieron a qPCR 28 extracciones de ADN del cepario proporcionados por Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), 27 correspondientes a especies patógenas y una correspondiente a especie saprófita; de éstas 14 resultaron positivas para la amplificación del producto de 423 bp del gen *lipL32*. La cepa Pacto I, serovar Patoc, Serogrupo Semarang, especie *L. biflexa*, no resultó positiva. La sensibilidad mostrada fue de 51,85% IC_{95%} (31,15 – 72,55) en tanto la especificidad obtenida fue de 100% IC_{95%} (95 – 100). **Ver tabla 1.**

La secuencia blanco del gen *lipL32* fue amplificada de las leptospiras patógenas pertenecientes a *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii* y *L. meyeri*. 14 de las 28 cepas utilizadas pertenecen *L. interrogans*, de las cuales 6 resultaron positivas a qPCR. La prueba fue capaz de amplificar todas las cepas pertenecientes a las especies *L. noguchii* y *L. weilii* incluidas en el ensayo. Se detectó el serovar Nicaragua, cepa 1011, perteneciente a la especie *L. noguchii*. **Ver Tabla 1.**

De los 69 aislamientos de aguas ambientales, animales domésticos y roedores sometidos al ensayo, se detectaron 7 (10,1%) IC_{95%} (2.296 – 17.993) con amplificación de la secuencia blanco *lipL32*, específico de especies patógenas de *Leptospira*. **Ver Tabla 2.**

De los 24 aislamientos de roedores 2 (8.3%) resultaron positivo, 3 (15%) de los 20 aislamientos de aguas ambientales y 2 (8%) de los 25 aislamientos de animales domésticos también resultaron positivos para la amplificación de la secuencia blanco *lipL32* de 423 bp. Sin embargo, de acuerdo a la prueba de X^2 no existe una diferencia significativa entre las frecuencias relativas de los tres tipos de muestras, $X^2 = 0.730$ $p=0.69$. **Ver Tabla 3 y Gráfica 1, 2 y 4.**

Se puede observar un rango amplio de Ct obtenido de las amplificaciones de las cepas de referencia, y los aislamientos a partir de orinas de animales domésticos, aguas ambientales y roedores correspondiente a 18.96 – 41.09 lo que significa que existe una heterogeneidad en la cantidad de bacterias tanto de los aislamientos como de las cepas de referencia. La cantidad de copias correspondientes al rango mencionado es de 808, 541,613 y 176 respectivamente en 1 ml de medio EMJH. La cantidad de bacterias, proporcional al número de copias obtenidas por replicación estaría relacionada directamente con las características de crecimiento correspondientes para cada serovar. **Ver tabla 5.**

Las curvas de melting presentadas en las **gráficas 3 y 5** (Anexos) tanto para los aislamientos de aguas ambientales, orina de animales domésticos y roedores, como para las cepas de referencia manifiestan un comportamiento homólogo, con temperaturas que oscilan entre los $82.5^{\circ}\text{C} \pm 1$; ésta coincide con la temperatura de melting atribuible a *lipL32* en ADN de *Leptospira interrogans*.

6. DISCUSIÓN

Existen muchos métodos en biología molecular, con utilidad clínica y epidemiológica para medir secuencias de ácidos nucleicos específicos. Sin embargo, la mayoría de estos métodos presentan uno o más de los siguientes inconvenientes, consumen mucho tiempo, exigen una labor intensa, son insuficientemente sensibles, no – cuantitativos, requieren el uso de radiactivos o tienen una sustancial probabilidad de contaminación cruzada (Reischl *et al*, 2002).

El diagnóstico molecular a través de qPCR ha cobrado mucho interés a nivel internacional en la rama de la salud, por su capacidad de detectar y cuantificar pequeñas cantidades de secuencias específicas de ácidos nucleicos, permitiendo medir cargas virales y bacterianas, por su rapidez y sensibilidad, así como por contemplar una reducción de riesgos para el personal del laboratorio (Valasek y Repa, 2005). Su utilidad práctica en este estudio se basó en la capacidad para identificar una secuencia del gen *lipL32*, específico de especies patógenas de leptospiras.

En este estudio se emplearon 28 extracciones del cepario de referencia, de los que fueron amplificadas 14, distribuidas en 12 serogrupos, mostrando una sensibilidad de 51.85%, diferente de la sensibilidad obtenida por Levett en Atlanta, USA (2005) quien determinó una sensibilidad del 100% al amplificar el ADN de leptospiras patógenas (*Leptospira alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* y *L. santarosai*), no así de las cepas apatógenas y especies fúngicas y bacterianas diferentes de *Leptospira*. No obstante la sensibilidad obtenida por Pérez y Salgado (2013) muestra gran similitud, siendo del 50%.

La baja sensibilidad de la prueba podría traducirse en la no recomendación del método como prueba de tamizaje en leptospirosis, puesto que la prueba no fue capaz de determinar como positivo las 27 extracciones del cepario de referencia caracterizadas como patógenas y los aislamientos de los animales domésticos y

roedores, de donde se esperaría aislar *Leptospira* patógena, pues no se aísla *Leptospira* saprófita de muestras animales según Céspedes (2010), obteniéndose 2 amplificaciones de roedores, 2 de animales domésticos y 3 de aguas ambientales de 69 aislamientos para la secuencia blanco del gen *lipL32*. Por otro lado la especificidad encontrada fue del 100%, al no observarse amplificación de la cepa Patoc I, de la especie *biflexa* en 10 repeticiones. Este resultado es consistente con los obtenidos por Levett (2005) y Campos (2009) en cuyo estudio obtuvo una Tm de 87°C correspondiente a LipL32 en ADN concentrado de *Leptospira interrogans*, la que se encuentra ausente en otras bacterias como *Salmonella enteritidis*, *Helicobacter pylori*, *Porfiromona gingivales* y *Klebsiella pneumoniae*.

La baja sensibilidad encontrada en este estudio puede deberse a factores intrínsecos tales como la presencia de agentes inhibidores de la enzima polimerasa, por ejemplo, hemoglobina o urea y otros no caracterizado aún; las condiciones de amplificación, especialmente la temperatura de hibridación, que de elevarse aumenta la especificidad de la reacción, sin embargo disminuye la sensibilidad, ya que entorpece la unión del cebador a la cadena molde (Pérez y Salgado, 2013); así como debido a errores humanos, desarrollo inapropiado del ensayo, fallo en la calidad de la extracción, excesivo calentamiento, el cual puede conducir a la producción parcial de ADNs de cadena sencilla, los que servirían como substratos inespecíficos para el *annealing*, con lo que se disminuiría la sensibilidad de la amplificación; y la posibilidad de que las espiroquetas observadas en el microscopio de campo oscuro, no se correspondan con especies patógenas de *Leptospira*.

Los cebadores empleados en el ensayo dirigido para una secuencia específica del gen *lipL32*, gen conservado para especies patógenas, demostró ser capaz de amplificar las leptospiras *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii* y *L. meyeri*, correspondientes a *Leptospira* patógena, no así la cepa Patoc I, de la especie *L. biflexa*, que es saprófita, resultados semejante a los resultados obtenidos

Levett (2005); sin embargo, la similitud en los resultados no es del todo igual, ya que Levett (2005) obtuvo la amplificación para los demás miembros de las especies patógenas de *Leptospira* a diferencia de este estudio, en el que no se encontró amplificación de *L. kirschneri* y *L. santarosai*, ambos de las especies de *Leptospiras* patógenas y de interés clínico – epidemiológico.

Se demostró la capacidad de la prueba de detectar *Leptospira* patógena en aislamientos provenientes de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores donde se amplificaron 7 (10,1%) de 69 muestras. En este estudio, el hecho de que hayan sido amplificados 7 aislamientos de 69 puede explicarse bajo las mismas premisas de las cepas de referencia expresadas arriba. Estos resultados pueden contrastarse con los obtenidos por Pérez y Salgado (2013) quienes amplificaron 3 (25%) de 12 muestras de suero y 5 (38%) de 13 muestras de orina, tomando en cuenta que los aislamientos fueron mantenidos y los ADN extraídos en las mismas condiciones.

Fue demostrada la elevada sensibilidad y utilidad práctica de la prueba al ser capaz de detectar hasta 176 bacterias en 1 ml de muestra, este resultado difiere respecto a lo encontrado por Campos (2009) quien a través de qPCR tiempo real, empleando el mismo cebador detectó 885 bacterias de *Leptospira* en 1 μ L de ADN de tejido renal de perro. Esto le convierte en una herramienta valiosa para la detección de *Leptospira* en pacientes en fase aguda y en fuentes de agua para consumo humano y animal.

7. CONCLUSIONES

- Es posible detectar el gen *lipL32* conservado para especies patógenas, mediante qPCR en tiempo real, en muestra de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores.
- La sensibilidad de la prueba fue baja, no obstante la especificidad fue alta.
- Se logró la amplificación de las especies *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. meyeri* y *L. noguchii* incluyendo el serovar Nicaragua, cepa 1011, perteneciente a la especie *L. noguchii*.
- Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real no evidenciaron una diferencia significativa entre las prevalencias de los tres tipos de muestras.
- La prueba fue capaz de detectar hasta 2 bacterias en 1 μ l.

8. RECOMENDACIONES

- Promover el uso del qPCR tiempo real como herramienta diagnóstica y de investigación.
- Implementar pruebas comparativas entre MAT y qPCR tiempo real para evaluar la concordancia de ambas pruebas.
- Utilizar el MAT y qPCR como pruebas complementarias para conocer clasificación serológica y molecular de los serogrupos circulantes en la región.
- Se recomiendan utilizar las condiciones de optimización implementadas en este estudio para amplificación del gen *lipL32*.
- Se recomienda el uso de cebadores para especies patógenas y saprófitas para excluir de las amplificaciones espiroquetas diferentes de *Leptospira* spp.
- Elaborar estudios de clasificación molecular en aislamientos más recientes.
- Publicar los resultados de esta investigación para futuras investigaciones, sirviendo como parámetro en la región para estudios semejantes.
- Divulgar los resultados de la investigación a las autoridades sanitarias para dar seguimiento y monitoreo a los focos de leptospirosis.

9. BIBLIOGRAFÍA

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, DC. OMS. 1977; Publicación científica: 354.

Adler B, de la Peña MA. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010; 140:287–296.

Adler B, De La Peña M. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. CO *Leptospira*, 4th ed. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley-Blackwell; 2010. Pp.: 527-47.

Andicoberry AC, García Peña FJ, Ortega Mora LM. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 2001; 16 (2): 205-225.

Athanazio DE, Silva C, Santos G, Rocha M, Vannier-Santos, A McBride, *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. Acta Trop. 2008; 105(2): 176- 180.

Barbagelata FS, Brihuega Fernández B, Grune LS, Gattarello MV, Correa PD, Petrakovsky MJ *et al.* Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. Rev. Cubana Med. Trop. [revista en Internet]. 2013; 65(2): 177-184.

Bezerra AL, Rômulo J, Azevedo É, Lima R, Feitosa LM, Carvalho *et al.* Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil, 2011. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(10): 859-866.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003; 3(12): 757-71.

Bolívar S, Lagares A, Varela L, et al. Prevalencia de *Leptospira interrogans* por PCR, en la población porcina del municipio de Baranoa-Atlántico, Colombia. Revista colombiana de ciencias de la salud 2012; 1(1): 11-16.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* spp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 (2): 839-58.

Brown KJ, Prescott. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. Can. Med. Assoc. 2008; 178(4): 399-401.

Céspedes ZM. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Rev. perú. med. exp. Salud pública. 2005, 22(4): 290-307.

Da Silva MV, Dias Camargo E, Vaz AJ, Batista L. Immunodiagnosis of human leptospirosis using saliva. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992; 86(5): 560-1.

Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. Vet Rec. 1996; 139(5):110-4.

Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA. Effect of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. Vet Rec. 1996; 139(13):319-20.

Ellis WA, Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1994; 10 (3): 463-478.

Ellis WA, Mc Donald AW, Yan KT. Prevalence of *Leptospira* spp in findings with 3 forms in equine leptospiral abortions. Equine Vet. J. 1994; J2(2): 105-108.

Espy MJ *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2006, p. 165–256.

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

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep; 39(9): 3303-10.

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

Fornazari F, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HE, Luvizotto MC, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods.* 2012; 90: 321–326.

Gallegos A, Sandí V. Leptospirosis. *Rev Medicina Costa Rica Centroamericana* 2010; 592:115-21.

Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, *et al.* Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 2006; 3(8): e308.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, *et al.* Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal General Microbiology* 1993; 139:1691-700.

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

Haake *et al*, Infect Immun. 2000 April; 68(4): 2276–2285.

Hamond C, Martins G, Lilenbaum W, Medeiros MA. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. VetRec. 2012; 171:105–106.

Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ, *et al*. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. Biochem Biophys Res Commun 2005; 333(4): 1341-47.

Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. J Am Vet Med Assoc. 1994 Dec 1; 205(11):1518-23.

Hernández P, Díaz C, Dalmau E, Quintero G. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. Journal Microbiology Methods 2011; 84(1):1-7.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 10: 413–417, 1992.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11: 1026–1030, 1993.

Johnson RC, & harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. J. Bacteriol. 1967; 94, 27–31

Langston C, Heuter K. Leptospirosis A re-emerging zoonotic disease. Vet. Clin. Small Anim. 2003; 33(4): 791-807.

Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. Gene 2000; 254(1-2): 19-28.

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

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006; 56, 671–673.

Lilenbaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. Res Vet Sci. 2009; 87:16–19.

Lux R, Moter A, Shi W. Chemotaxis in pathogenic spirochetes direct movement toward targeting tissues. J Mol Microbiol Biotechnol 2000; 2(4): 355-64.

Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. Nature. 2009; 460, 762–765.

Mark A. Valasek and Joyce J. Repa. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ. 2005; 29: 151–159.

McDonough, P. 2001. Leptospirosis en caninos - estado actual [en línea]. IVIS. <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/mcdononough_es/ivis.pdf>. [Consulta: 25 julio 2014].

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

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262: 56–61.

Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987; 155: 335–350.

Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol 2004; 186(7): 2164-72.

OMS. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008.

Parma AE, Seijo A, Lucchesi PM, Deodato B, Sanz ME. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospires by means of the polymerase chain reaction. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 1997 July; 39(4): 203-208.

Pérez LE, Salgado SK. Estandarización de una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos. UNAN-León. Nicaragua, 2013; P: 16-27.

Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flab results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol. Microbiol. 2001; 40 (1): 189–99.

Quinn, P., B. Markey, M. Carter, W. Donnelly y F. Leonard. 2005. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia. Zaragoza, España.

Reischl U, Wittwer CT, and Cockerill F. Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications; Microbiology and Food Analysis. New York: Springer-Verlag, 2002.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature 2003; 422(6934): 888-93.

Ristow P, Bourhy P, Kerneis S. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 2008; 154:1309-17.

Román H, Terán FM, Alvarez WJ, González MA. Descripción epidemiológica de un brote de leptospirosis en el departamento de Río San Juan, Nicaragua. Mayo-Julio 1999. Tesis para optar al título de Maestro en Salud Pública. Centro de Investigaciones y Estudios para la Salud (CIES). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (U.N.A.N.-Managua). Julio 2006.

Rosario LA, Arencibia DF, Batista N, Jirón W, *et al.* Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* por métodos fenotípicos y moleculares en la República de Nicaragua. *VacciMonitor*. 2012; 21(3): 6-12.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354, 1985.

Satz, L., A. Kornblihtt. La reacción en cadena de polimerasa. El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy*. 1993; 4(23): Marzo 1993. <<http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm>>. [Consulta: 31 de julio de 2014].

Satz LM, Kornblihtt AR. La reacción en cadena de la polimerasa. *Revist. Divulg. Cient. y Technol. Asoc.Cien. Hoy*. 1993; 4(23).

Silva MV, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Ferreira AW, Barbosa PR. Application of anti-leptospira ELISA-IgM for the etiologic elucidation of meningitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996; 38(2): 153-56.

Solana T, Olea A, Riedemann S, Torres M. Prevalencia de leptospirosis en adultos Chile, 2003. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29 (6): 641-647.

Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM. Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira*

species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. J Vet Diagn Invest. 2011; 23:743–752.

Tepstra W, Hartskeerl R, Smits H, Korver H. International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Amsterdam: Royal Tropical Institute; 2006.

Terpstra, W. Human leptospirosis: constraints in diagnosis and research. In: Leptospirosis on the African Continent (Terpstra, W.J. and Korver, H., Eds.), Proc. CEC/STD 3 Research Meeting, Harare, Zimbabwe. 1992; p. 12.

Victoria B, Fernández C, Rodríguez JE, Obregón AM, Rodríguez I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. Rev Cubana Med Trop [revista en la Internet]. 2002 Abril [citado 2014 Ene 12]; 54(1): 48-51.

Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira FS de, Costa AD de Souza, Hillen L, Pereira MM. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [serial on the Internet]. 2010 May [cited 2014 Jun 12]; 105(3): 353-355

Wilson K, Walker J. 2005. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. (6th. ed.). Cambridge University Press. New York. U.S.A.

Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol 1997; 35(8): 1938-42.

Yang, CW, MS Wu, MS Pan, WS, Hsieh A. Vandewalle and C. Huang. The *Leptospira* outer Membrane protein LipL32 Induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 13(8): 2037-2045.

Zamora J, Riedemann S. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. Arch. Med. Vet. 1999; 31(2): 152-156.

Zunino ME, Pizarro P, Leptospirosis. Puesta al día. Rev. chil. infectol. 2007; 24(3).

ANEXOS

Tabla 1. Cepas del CNDR de *Leptospira* estudiadas y resultado a qPCR tiempo real.

| Cepas de <i>Leptospira</i> estudiadas | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------|
| Especies (genómica) | Serogrupos | Serovares | Cepas | LipL32q-PCR | |
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | Ballico | Positiva | |
| | Autumnalis | Autumnalis | Akiyami A | Negativo | |
| | Bataviae | Bataviae | Swart | Negativo | |
| | Canicola | Canicola | Hond Utrecht IV | Positiva | |
| | Djasiman | Djasiman | Djasiman | Positiva | |
| | Hebdomadis | Hebdomadis | Hebdomadis | Negativo | |
| | Icterohaemorrhagica | Icterohaemorrhagica | Icterohaemorrhagica | RGA | Positiva |
| | | | Copenhageni | M20 | Negativo |
| | | | Copenhageni | Wijnberg | Negativo |
| | | | Icterohaemorrhagica | Kantorowic | Positiva |
| | Pomona | Pomona | Pomona | Positiva | |
| | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem | Negativo | |
| Sejroe | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno | Negativo | |
| | | Wolffi | 3705 | Negativo | |
| <i>L. noguchii</i> | Australis | Nicaragua | 1011 | Positiva | |
| | Louisiana | Louisiana | LSU 1945 | Positiva | |
| | Panama | Panama | CZ 214 | Positiva | |
| <i>L. weilii</i> | Celledoni | Celledoni | Celledoni | Positiva | |
| | Manhao | Qingshui | L 105 | Positiva | |
| | Sarmin | Sarm111 | Sarmin | Positiva | |
| <i>L. kirschneri</i> | Cynopteri | Cynopteri | 3522 C | Negativo | |
| | Grippotyphosa | Grippotyphosa | Moskva V | Negativo | |
| <i>L. borgpetersenii</i> | Javanica | Javanica | Veldrat Batavia | Positiva | |
| | Mini | Mini | Sari | Negativo | |
| | Sejroe | Sejroe | M84 | Negativo | |
| <i>L. meyeri</i> | Ranarum | Ranarum | ICF | Positiva | |
| <i>L. santarosai</i> | Shermani | Shermani | 1342 K | Negativo | |
| <i>L. biflexa</i> | Semaranga | Patoc | Patoc I | Negativo | |

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos a partir de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores positivos a qPCR, obtenidos del muestreo de leptospirosis en el año 2012.

| | Frecuencia | Porcentaje | IC 95% |
|-----------------|-------------------|-------------------|---------------|
| Negativo | 62 | 89.9 | 2.296-17.993 |
| Positivo | 7 | 10.1 | 2.296-17.993 |
| Total | 69 | 100 | 2.296-17.993 |

Tabla 3. Identidad de aislamientos positivos a qPCR, valor de Ct y temperatura de melting.

| Código | Especie | Aislamiento | Resultado qPCR | Ct | mt |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------|------------|
| Lep-636-12 | Roedor | Positivo | Positivo | 37.05 | 82.5°C ± 1 |
| Lep-639-12 | Roedor | Positivo | Positivo | 18.96 | 82.5°C ± 1 |
| Lep-549-12 | Agua | Positivo | Positivo | 35.65 | 82.5°C ± 1 |
| Lep-618-12 | Agua | Positivo | Positivo | 38.78 | 82.5°C ± 1 |
| Lep-631-12 | Agua | Positivo | Positivo | 34.63 | 82.5°C ± 1 |
| Lep 522-12 | Doméstico (Bovino) | Positivo | Positivo | 34.06 | 82.5°C ± 1 |
| Lep 523-12 | Doméstico (Bovino) | Positivo | Positivo | 41.09 | 82.5°C ± 1 |

Tabla 4. Cepario de referencia de Holanda

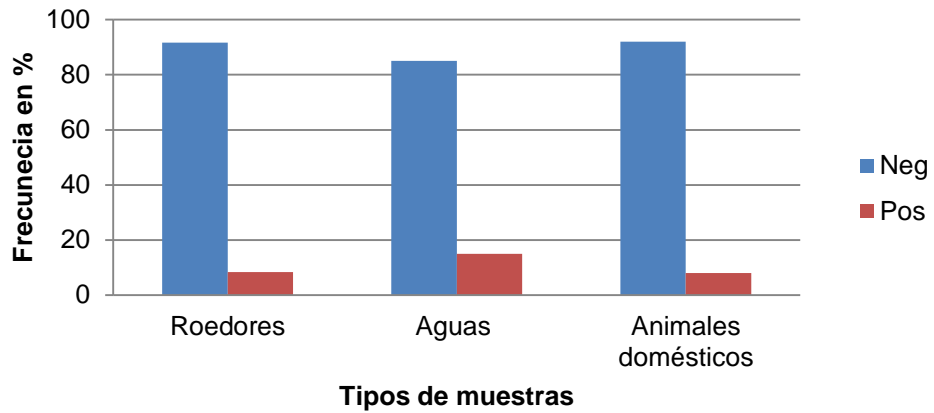
| Id | Especies (genómica) | Serogrupo | Serovar | Cepa |
|-----------|----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| 1 | <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | Ballico |
| 2 | <i>L. noguchii</i> | Australis | Nicaragua | 1011 |
| 3 | <i>L. interrogans</i> | Autumnalis | Autumnalis | Akiyami A |
| 5 | <i>L. interrogans</i> | Bataviae | Bataviae | Swart |
| 6 | <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | Hond Utrecht IV |
| 7 | <i>L. weilii</i> | Celledoni | Celledoni | Celledoni |
| 8 | <i>L. kirschneri</i> | Cynopteri | Cynopteri | 3522 C |
| 9 | <i>L. interrogans</i> | Djasiman | Djasiman | Djasiman |
| 10 | <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa | Grippotyphosa | Moskva V |
| 11 | <i>L. interrogans</i> | Hebdomadis | Hebdomadis | Hebdomadis |
| 12 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagia | Icterohaemorrhagia | RGA |
| 13 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagia | Copenhageni | M20 |
| 14 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagia | Copenhageni | Wijnberg |
| 15 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagia | Icterohaemorrhagia | Kantorowic |
| 16 | <i>L. borgpetersenii</i> | Javanica | Javanica | Veldrat Batavia |
| 17 | <i>L. noguchii</i> | Louisiana | Louisiana | LSU 1945 |
| 18 | <i>L. weilii</i> | Manhao | Qingshui | L 105 |
| 19 | <i>L. borgpetersenii</i> | Mini | Mini | Sari |
| 20 | <i>L. noguchii</i> | Panama | Panama | CZ 214 |
| 21 | <i>L. interrogans</i> | Pomona | Pomona | Pomona |
| 22 | <i>L. interrogans</i> | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem |
| 23 | <i>L. meyeri</i> | Ranarum | Ranarum | ICF |
| 24 | <i>L. weilii</i> | Sarmin | Sarm111 | Sarmin |

| | | | | |
|-----------|--------------------------|-----------|----------|----------------|
| 25 | <i>L. borgpetersenii</i> | Sejroe | Sejroe | M84 |
| 26 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno |
| 27 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Wolffi | 3705 |
| 28 | <i>L. biflexa</i> | Semaranga | Patoc | Patoc 1 |
| 29 | <i>L. santarosai</i> | Shermani | Shermani | 1342 K |

Tabla 5. Número de copias de *Leptospira* patógena presente en cada ml de medio EMJH.

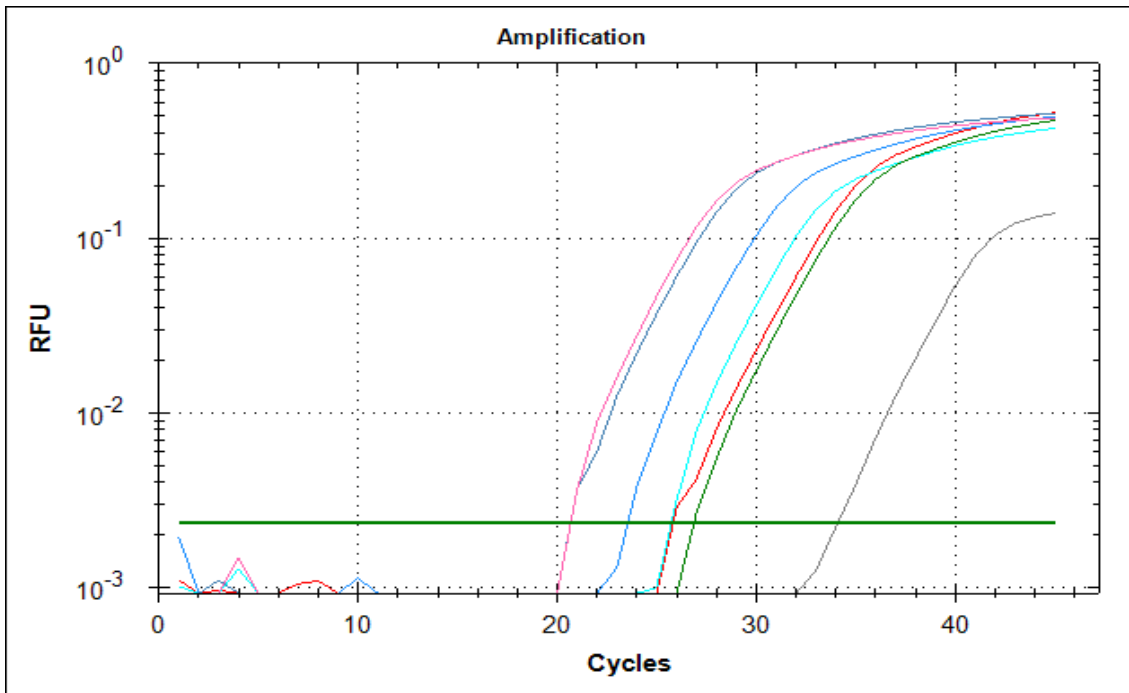
| Especie | Código | Ct muestra | Ct de corte | Δ de Ct | Copias en 1 μ l | μ l de elusión | Copias en 1600 μ l | Copias/ml |
|--------------------|------------|------------|-------------|----------------|---------------------|--------------------|------------------------|-------------|
| Roedor | Lep-636-12 | 37.05 | 42 | 4.95 | 30.91 | 150 | 4636.49 | 2897 |
| Roedor | Lep-639-12 | 18.96 | 42 | 23.04 | 8,624,443.87 | 150 | 1,293,666,581 | 808,541,613 |
| Agua | Lep-549-12 | 35.65 | 42 | 6.35 | 81.57 | 150 | 12,235.78 | 7,647 |
| Agua | Lep-618-12 | 38.78 | 42 | 3.22 | 9.32 | 150 | 1,397.68 | 873 |
| Agua | Lep-631-12 | 34.63 | 42 | 7.37 | 165.42 | 150 | 24,813.17 | 15,508 |
| Doméstico (Bovino) | Lep 522-12 | 34.06 | 42 | 7.94 | 245.57 | 150 | 36,835.74 | 23,022 |
| Doméstico (Bovino) | Lep 523-12 | 41.09 | 42 | 0.91 | 1.88 | 150 | 281.85 | 176 |

Gráfica 1.

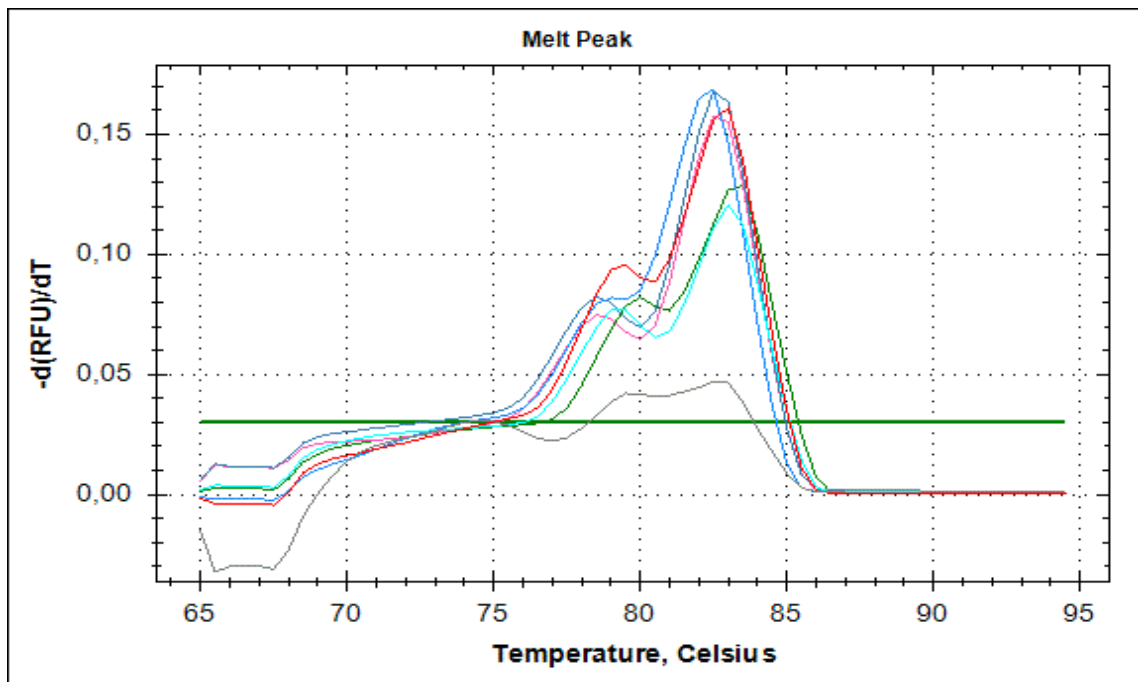


Frecuencias de *Leptospira* patógena en aislamientos a partir de tres tipos de muestras

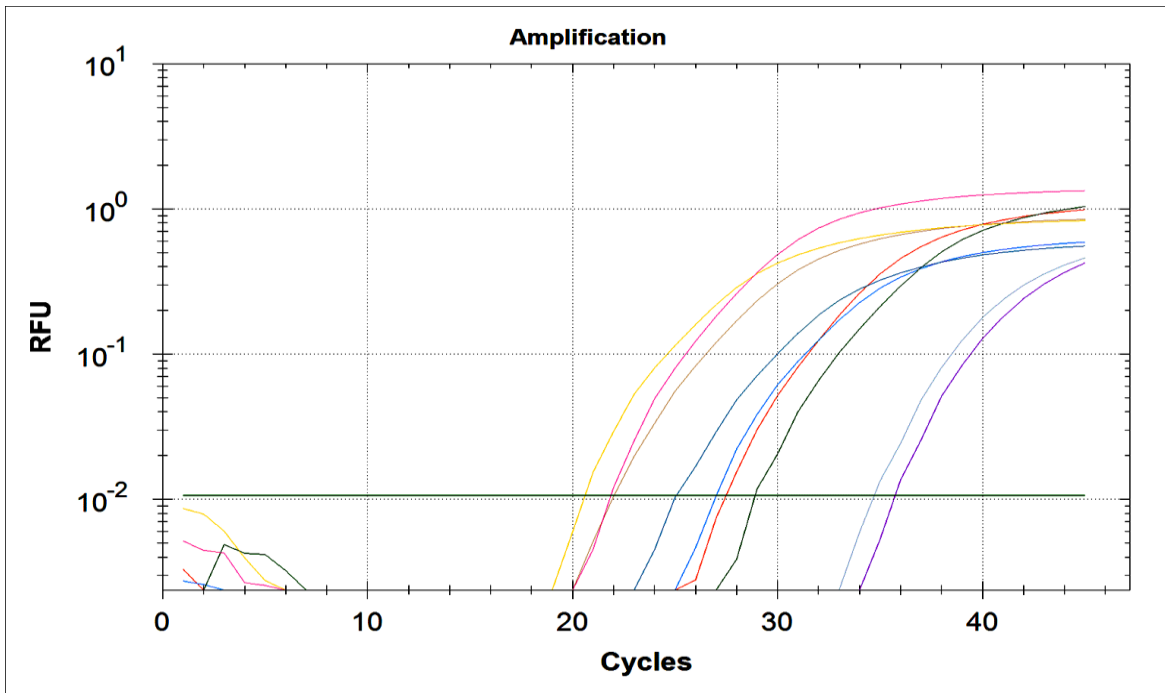
Pruebas de Chi-cuadrado (χ^2) = 0.730 $p=0.69$



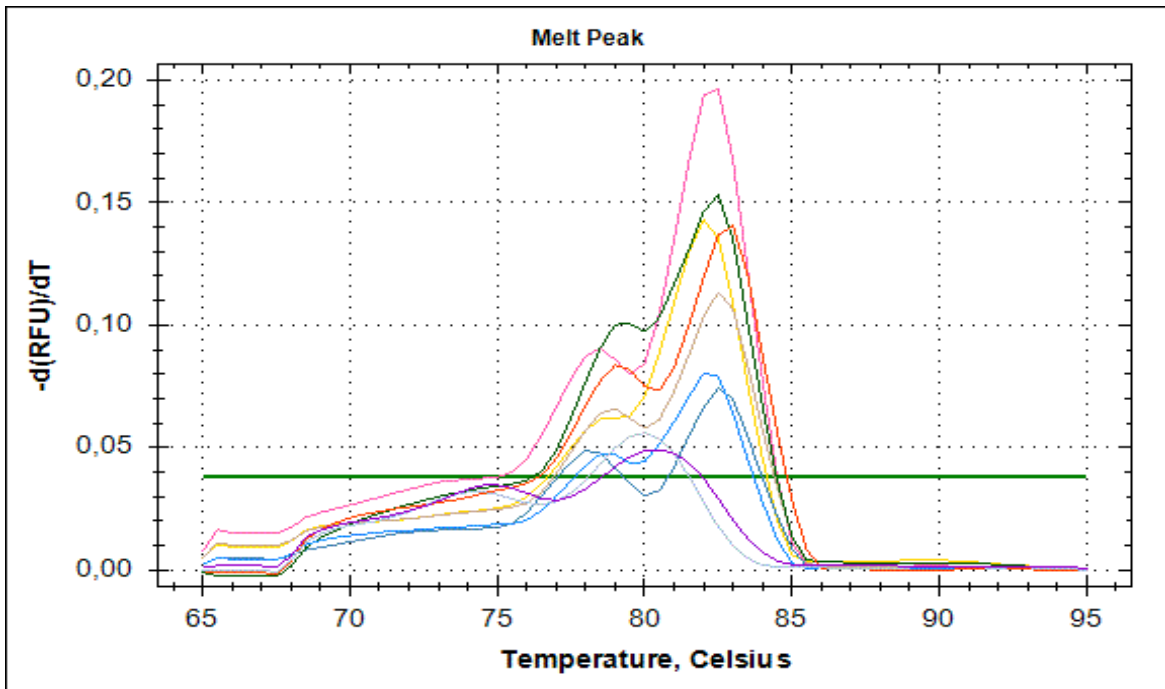
Grafica 2. Curvas de amplificación de *lipL32* para *Leptospira* patógenas obtenidas en el termociclador Mini-Opticum® a partir de cepas de referencia y aislamientos de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores. 48 reacciones.



Gráfica 3. Curva de disociación (curva de melting) específica para el gen *lipL32* conservado en especies patógenas de *Leptospira* obtenidas en el termociclador Mini-Opticum® a partir de cepas de referencia y aislamientos de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores. 48 reacciones.

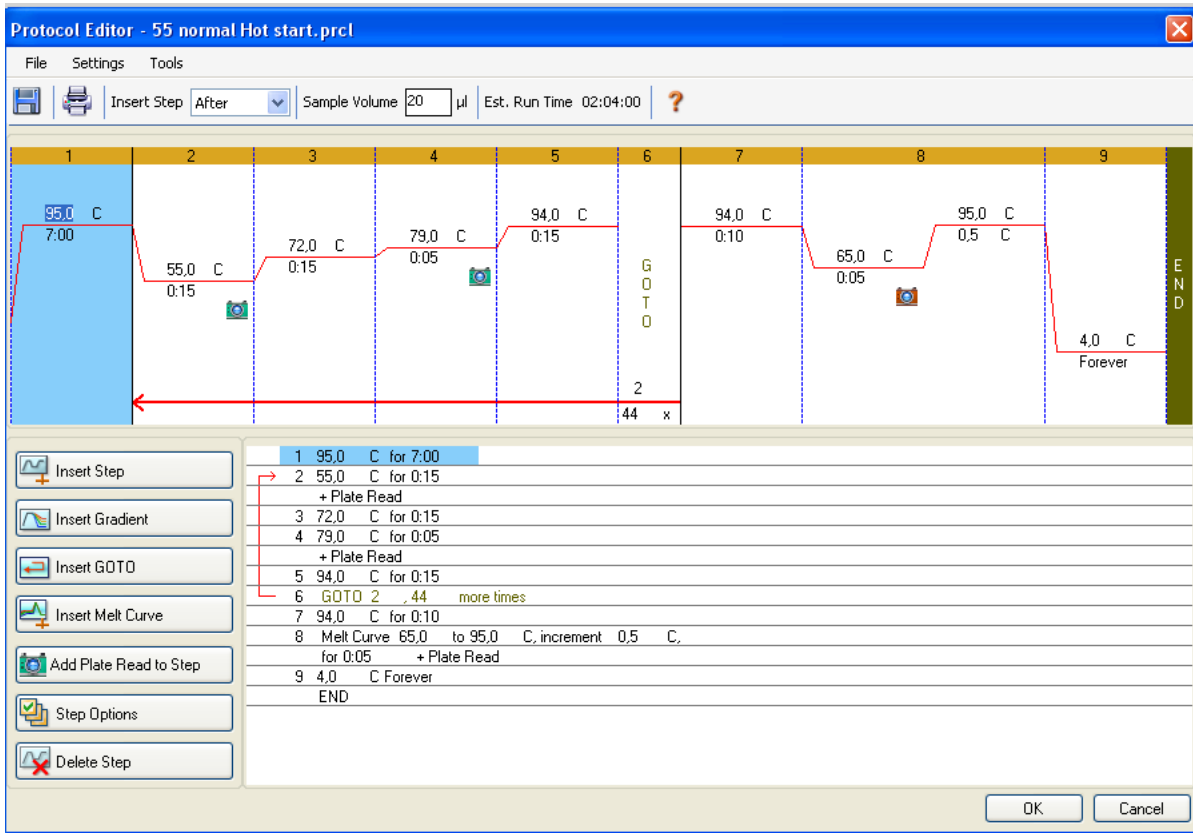


Gráfica 4. Curvas de amplificación de *lipL32* para *Leptospiras* patógenas obtenidas en el termociclador Mini-Opticum® a partir de cepas de referencia y aislamientos de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores. 48 reacciones.



Gráfica 5. Curva de disociación (curva de melting) específica para el gen *lipL32* conservado en especies patógenas de *Leptospira* obtenidas en el termociclador Mini-Opticum® a partir de cepas de referencia y aislamientos de muestras de orina de animales domésticos, aguas ambientales y roedores. 48 reacciones.

Gráfica 6. Protocolo de qPCR tiempo real. Termociclador Mini-Opticum®.



Gráfica 7. Representación Gráfica del aliniamiento del iniciador para el gen *lipL32* según realizado en el programa bioinformático BLAST®, y los número de acceso a las secuencias en el Gen Bank.

