

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA

Tema:

Determinación de *Leptospira Interrogans* en animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua en el período comprendido 2009-2010.

Autores:

Adriana Isabel García Bárcenas.

Vanessa de los Ángeles Rivas Lara.

Tutores:

MSc. Jessica Sheleby, DMV.

MSc. José Luis Bonilla, DMV.

León, 6 Mayo del 2011

¡A la libertad por la Universidad!

RESUMEN

La técnica de Microaglutinación con antígenos vivos (MAT) es considerada “Gold Standard” o de referencia en la confirmación de casos de Leptospirosis; sin embargo esta prueba presenta algunos inconvenientes al no detectar los animales portadores, pero la prueba de reacción en cadena de la polimerasa puede solventar este inconveniente. El objetivo principal del estudio fue determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en muestras de suero y orina de animales domésticos, mediante la implementación de las técnicas MAT y PCR. Se emplearon dos técnicas diagnósticas para la detección de *leptospira interrogans* en muestras de suero (MAT) y orina (PCR) de animales domésticos. Se examinaron muestras de 62 animales domésticos (62 muestras de orina y 56 muestras de suero sanguíneo) provenientes de diferentes localidades de distintos municipios de Nicaragua. De 56 muestras de suero recolectadas 24 (42.85%) demostraron ser reactores a *Leptospira* por el MAT cualitativo a partir de una dilución de 1:400. Mediante el MAT cuantitativo se tipificaron los serovares de *Leptospira*, presentado los bovinos mayor reactividad frente al serovar *Patoc e icterohaemorrhagia*; Porcinos serovar *Patoc, Copenhageni y Nicaragua*; Caninos serovares *Canicola, Copenhageni*; en equinos no se encontraron reactores. Las muestras de orina fueron analizadas por PCR utilizando el cebador LipL21 y como controles una cepa patógena y una saprofita (Control positivo: *Especie, Interrogans, Serogrupo Icterohaemorrhagia, Serovar copenhageni, cepa Wijnber* y control negativo *Especie, biflexa, Serogrupo Semarang, Serovar patoc, cepa patoc 1*). De las 62 muestras de orina recolectadas, ninguna resultó positiva a la prueba. La presencia de sustancias endógenas en la orina así como factores asociados a la conservación y procesamiento de las muestras pudieron influir en el resultado por PCR.

Palabras claves: *Leptospira*, MAT, PCR.

DEDICATORIAS

Dedicamos este trabajo a:

DIOS:

Por habernos dado la vida, inteligencia, capacidad y la fuerza de voluntad para lograr finalizar la carrera.

NUESTROS PADRES:

Carlos García y Martha Bárcenas.

Jorge Rivas y Reyna Lara.

Por estar con nosotras en los momentos más difíciles de nuestra vida, por su comprensión, su apoyo y su amor incondicional.

NUESTRAS FAMILIAS:

Por todo el apoyo, cariño y paciencia que nos han brindado en el transcurso de los años.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a:

Dios:

Por acompañarnos siempre.

Nuestros Padres y familiares:

Por el apoyo moral y económico brindado.

Nuestros Tutores:

Dr. José Luis Bonilla y Dra. Jessica Sheleby por dedicarnos parte de su tiempo y ayuda en la realización de esta investigación, por ser amables y comprensivos... ¡Muchas Gracias!

Agradecemos a todas las personas que nos ayudaron en la realización de este trabajo, al personal de los laboratorios Lic. Gladys Castillo, MSc. Byron Flores por la disponibilidad y paciencia con que nos atendieron.

A nuestros amigos Ana Flores, Uriel Zelaya, Axel Guillén y compañeros que estuvieron con nosotros en todo momento y nos dedican su aprecio, su tiempo, por comprendernos y apoyarnos.

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

5Fu: 5 fluoracilo.

SFIH: Síndrome febril icterohaemorrágico.

Spp: Subespecie.

LipL: Lipoproteínas de la membrana de Leptospira.

bp: Par de base.

MAT: Microaglutinación de antígenos vivos.

OPS/OMS: Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.

CEVEDI: Centro veterinario de diagnóstico e investigación.

CNDR: Centro nacional de referencia.

Ac.: Anticuerpo.

EMJH: Medio para el cultivo de Leptospira Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris.

PBS: tampón fosfato- solución salina.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

IgM: Inmunoglobulina M; es uno de los cinco isotipos de inmunoglobulinas (G, A, M, E, D).

dNTP: Desoxirribonucleósidos-trifosfato.

MINSA: Ministerio Nacional de Salud.

Taq: ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* termófilo.

ÍNDICE

RESUMEN	2
DEDICATORIO	3
AGRADECIMIENTO	4
ABREVIATURAS	5
I. INTRODUCCION	8
II. ANTECEDENTES	10
III. JUSTIFICACION	13
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
V. OBJETIVOS	
5.1 objetivo general	15
5.2 objetivos específicos	15
VI. MARCO TEORICO	
6.1 ¿Qué es Leptospirosis?	16
6.2 Etiología	16
6.3 Características y morfología	16
6.4 Taxonomía	16
6.4.1 Clasificación taxonómica	17
6.5 Resistencia del agente etiológico	18
6.7 Especies susceptibles	18
6.8 Fuentes de infección	19
6.9 Sintomatología	19
6.9.1 Humano	19
6.9.2 Bovino	20
6.9.3 Cerdo	20
6.9.4 Ovino/caprino	20

6.9.5	Caninos y gatos	21
6.9.6	Equino	21
6.10	Diagnostico	21
6.10.1	Diagnostico epidemiológico	21
6.10.2	Diagnóstico clínico	21
6.10.3	Diagnostico laboratorial	21
6.11	Técnicas indirecta	22
6.11.1	MAT	22
6.12	Técnicas directas	24
6.12.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
6.12.2	Fundamento e importancia	26
6.12.3	Optimización de la PCR	26
6.12.4	Inhibición de la PCR	27
6.12.5	Estrategias para la detección de Leptospira en orina por PCR	28
6.12.6	Aplicación	28
6.13	Diagnostico diferencial	29
VII.	DISEÑO METODOLOGICO	30
VIII.	RESULTADOS	34
IX.	DISCUSION	38
X.	CONCLUSIONES	40
XI.	RECOMENDACIONES	41
XII.	REFERENCIAS	42
XIII.	ANEXOS	46

INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por leptospiras patógenas. Es una zoonosis bacteriana de amplia distribución mundial con predominio en regiones tropicales y ha emergido como un importante problema de salud [1]. Es fundamentalmente una infección de los animales; afecta más de 160 especies de animales domésticos y silvestres, que constituyen el reservorio y la fuente de infección al hombre. Las especies más afectadas son los roedores y los animales domésticos especialmente el Perro, el ganado Bovino, Porcino y Equino [2]. La mayoría de las infecciones por *Leptospira* spp cursan de manera subclínica, aunque en algunas ocasiones, pueden darse casos de enfermedad grave. La sintomatología es inespecífica y común a un gran número de afecciones, observándose ictericia, hemoglobinuria, hematuria, evidencias de daño renal, meningitis e incluso mortalidad [3]. Las hembras preñadas pueden abortar debido a la pirexia mantenida y la producción láctea prácticamente desaparece [4].

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico laboratorial de la leptospirosis se pueden dividir en dos grandes grupos: técnicas indirectas que detectan anticuerpos frente a las leptospiras, y técnicas directas que se basan en la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales [5]. Las técnicas serológicas son las pruebas laboratoriales más utilizadas tanto para el diagnóstico como para la realización de estudios epidemiológicos. La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional de Epizootias (OIE) es la Microaglutinación con antígenos vivos (MAT), que se emplea para detectar anticuerpos antileptospira en suero [6]; es además la prueba oficial para la exportación e importación de animales [7]. Esta prueba es altamente específica y se puede realizar MAT en diferentes tipos de muestra; no obstante, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacunales de los de infección [8], resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva [9], requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras [10] y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico [11]. Presenta sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero para confirmar el caso, lo que retarda el diagnóstico y el tratamiento [11].

La técnica de tinción inmunoquímica más utilizada es, la inmunofluorescencia, útil para la detección de leptospiras en la orina [12]. La técnica de inmunofluorescencia permite detectar antígenos bacterianos en muestras de tejido animal y el grado de autólisis de la muestra tiene menor importancia. Así, la técnica permite revelar presencia o ausencia de antígenos, sin importar la presencia o no de lesiones [7]. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia. [13]

El aislamiento se considera como una de las técnicas más sensibles para el diagnóstico de la leptospirosis aguda y crónica, tanto en medio de cultivo, como por inoculación en

animales de experimentación. Su mayor desventaja es que requiere mucho tiempo y laboratorios especializados [9,10, 5, 14, 15]

En la actualidad se han desarrollado técnicas de biología molecular que juegan un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, entre estas técnicas encontramos las técnicas de hibridación con sondas de ADN marcadas y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospiras en muestras clínicas; permitiendo la identificación de especies de leptospiras patógenas y no patógenas [13], así como el diagnóstico de infecciones agudas [14]. La técnica de PCR actualmente se ha considerado como la más eficaz para la detección de leptospiras en orina [16, 17]; porque a partir de una muestra pequeña de ADN se puede obtener una cantidad favorable para el estudio que se va a realizar. Dentro de sus desventajas la PCR se puede reproducir solamente partes del genoma en donde se conoce por lo menos una mínima secuencia de 20-40 pb, se necesitan “cebadores o iniciadores” específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar y la polimerización puede tener errores al sintetizar ADN[18].

El presente estudio tuvo por objetivo la detección de *leptospiras interrogans* mediante el uso de la técnica de MAT y PCR en muestras de suero sanguíneo y orina respectivamente, de animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua.

ANTECEDENTES

La leptospirosis es una enfermedad que fue descrita por primera vez en 1880, en El Cairo por Larrey y cuyos estudios se siguieron a los de Landuozy en 1883. Fue Weil quien en 1886 la descubrió tras observar minuciosamente cuatro casos clínicos en seres humanos. Posteriormente la leptospirosis fue designada por Goldschmidt como enfermedad de Weil [19].

Las técnicas más utilizadas para el diagnóstico laboratorial de la leptospirosis son las serológicas tanto para el diagnóstico, como para la realización de estudios epidemiológicos. La prueba de referencia recomendada por la OMS y la OIE es la Microaglutinación con antígenos vivos (MAT), que se emplea para detectar anticuerpos antileptospira en suero [6]; el desarrollo de técnicas de biología molecular juegan un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, con la introducción de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa ha permitido la identificación de especies de leptospirosis patógenas y no patógenas [20], así como el diagnóstico de infecciones agudas. En 1944 Kary Banks Mullis, introdujo la técnica PCR para amplificar secuencias de ADN.

En 1991 en Holanda se desarrolló un método mejorado para la detección rápida, específica y sensible de ADN de *Leptospira Interrogans serovar hardjo* (subtipo hardjobovis) por medio de PCR en preparados de muestras de orina en ganado bovino. Para el estudio se utilizaron 100 vacas libres de leptospirosis, 4 vacas infectadas experimentalmente y 2 como control negativo. Los resultados del PCR detectaron solamente 5-10 células de *Leptospira* por ml de orina sin la necesidad de la hibridación [21].

En 1993 se detectaron leptospirosis de varios serovares en sueros colectados en pacientes utilizando el PCR. El examen reveló polimorfismo del ADN interespecies entre leptospirosis interrogans y otras especies de leptospirosis. Los serovares encontrados fueron *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *hardjo*, *pomona*, *gryppotiphosa* [22].

En el año de 1994 se detectaron *Leptospiras* patógenas mediante PCR en orinas de cerdos y bovinos, amplificando una secuencia de ARN ribosomal [23]. Para el mismo año se investigaron muestras de orina de pacientes en diferentes estados de leptospirosis por el PCR, utilizando este método como una alternativa para el cultivo. En el 90% de los casos fueron detectadas leptospirosis de muestras de orina. Las muestras de orina de pacientes tratados con antibióticos fueron positivas al PCR. En muestras biológicas de riñón de cerdo y bovino fueron demostradas leptospirosis sin requerirse cultivo y aislamiento. Estos trabajos se emplearon en 25 aislamientos de pomona, llegando a la conclusión que el PCR es una técnica simple y rápida para detección de *L. interrogans* y el serovar [24].

En 2007 en Brasil se realizó un estudio sobre la detección de *Leptospira* patógenas en orina de Ganado infectado de forma natural por PCR anidado, usando el primer LipL32, los amplicones (497 bp) fueron obtenidos de 21 serovares patogénicos de referencia pertenecientes a cuatro especies (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*).

Se tomaron para el estudio 30 muestras de orina, 26 de ganado sospechoso de leptospirosis, 4 de animales sin signos de la enfermedad como control negativo, se realizó cultivos de *Leptospira* a 10 de las muestras recolectadas del ganado sospechoso de leptospirosis. El 80% de las muestras que fueron recolectadas del ganado sospechoso de leptospirosis dio positivo al PCR siendo el límite de detección de ADN en las muestras clínicas de 200 pg, el PCR anidado también detectó todos los serovares de especies de leptospirosis patógenas utilizadas en el estudio. No hubo amplificación de ningún producto de ADN de otra especie de bacteria común del tracto urogenital o de la especie no patógena *L.biflexa serovar Andamana*. El PCR anidado demostró una alta especificidad y sensibilidad para la detección de serovares patógenos en la orina del ganado [25].

En Venezuela (2007) se realizó el diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico (SFIH); el objetivo consistía en evaluar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la leptospirosis humana, utilizando dos pares de iniciadores específicos para las leptospirosis patógenas. Se examinaron por la prueba serológica MAT y la PCR muestras de orina y suero de 73 pacientes con SFIH y epidemiología compatible con leptospirosis. Muestras de 10 pacientes (55,5%) con diagnóstico confirmado de leptospirosis por MAT resultaron positivas por PCR. El 28% de los sueros de pacientes clasificados por serología como casos no confirmados resultó PCR positivo, demostrando el valor de la PCR en el diagnóstico temprano de la leptospirosis humana. La comparación de los resultados de PCR en muestras de orina y suero determinó una mayor sensibilidad de esta técnica en muestras de orina. Considerando las diferentes fases de la leptospirosis en el análisis de los resultados de la PCR, se demostró la utilidad de las muestras de orina en el diagnóstico precoz de la enfermedad [1].

En Perú (2007) se realizó un estudio sobre la Estandarización y optimización de la prueba de PCR dirigida al gen ribosomal (rrs 16S) de *Leptospira* spp., para luego validar su uso en muestras de pacientes humanos con síndrome febril captados en zonas endémicas del Perú como un diagnóstico rápido de leptospirosis en muestras de sangre y orina. Se optimizó la prueba con muestras de ADN de *Leptospira* de diferentes especies patógenas y no patógenas, y se determinó en 180 muestras clínicas de pacientes con sospecha de leptospirosis su sensibilidad y especificidad en comparación con la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y ELISA IgM. El PCR estandarizado 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% en muestras de sangre antes de los ocho primeros días de enfermedad y de 30% cuando el tiempo de enfermedad fue mayor. Considerando que el PCR en orina tiene una baja sensibilidad. Siendo más sensible que las pruebas serológicas en los primeros días de enfermedad y poco sensible cuando la carga bacteriana es baja en sangre [26].

En el 2010 en Colombia se realizó un estudio sobre la Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp en Colombia. El objetivo del estudio consistió en aplicar y validar la prueba de PCR convencional, usando dos pares de iniciadores descritos previamente y dirigidos a los genes lipL32 (PCR simple) y secY/flaB (PCR múltiple), con el fin de evaluar su aplicación para identificar especies

patógenas y saprófitas de *Leptospira* spp. Se usaron 22 cepas de referencia internacional y 12 aislamientos colombianos. Se determinó el nivel de detección de cada pareja de iniciadores, su especificidad frente a otros microorganismos causantes de enfermedades endémicas en Colombia y su capacidad de identificar especies dentro del grupo de *Leptospira*. Obteniendo como resultado que el límite de detección de la PCR simple lipL32 fue una dilución 1:10000 y para la PCR múltiple secY/flaB fue una dilución 1:100 para el gen secY y 1:1000 para flaB. La especificidad de todos los iniciadores fue de 100%. La PCR simple lipL32, mostró amplicones específicos para 21/22 cepas de referencia mientras, que la PCR múltiple secY/flaB lo fue para 18/22 cepas. De los 12 aislamientos colombianos, siete fueron positivos por PCR lipL32 y seis lo fueron por PCR secY/flaB [27].

JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad de carácter zoonótico, representa una gran implicación en la salud pública, animal y económica del país. Un brote no controlado de leptospirosis puede ocasionar muertes y enfermos en seres humanos y animales, siendo estos últimos, los que pueden actuar como principales portadores.

En Nicaragua las técnicas que comúnmente se utilizan para la detección de *Leptospira* son las técnicas de MAT y el aislamiento de la bacteria. El MAT es una prueba altamente específica; sin embargo presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda y por lo general se requiere de una segunda muestra de suero para confirmar el caso, lo que retarda el diagnóstico y el tratamiento. El aislamiento de la bacteria es también una técnica altamente sensible; pero tarda mucho tiempo, tiene un costo muy alto y se necesita de un laboratorio y un personal calificado.

Con la introducción del PCR como una nueva técnica para el diagnóstico de leptospirosis se ha facilitado la detección y confirmación rápida y específica de los ácidos nucleicos de microorganismos patógenos en una muestra problema, con la característica de tener una alta especificidad y sensibilidad, permitiendo también determinar a portadores asintomáticos siendo de gran utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad. En la actualidad no se cuenta con muchos estudios en el país realizados por medio de PCR para la detección de leptospirosis en animales; al ser una prueba que permite una obtención rápida de resultados, examinar mayores cantidad de muestras y de ensayos en corto tiempo y sin necesidad de ningún proceso adicional y ser sistemas cerrados con riesgos de contaminación bajos.

De ahí surge la importancia de realizar un estudio para la determinación de *leptospiras interrogans* implementando de forma conjunta las técnicas de MAT y PCR, puesto que ambas técnicas son específicas permitirán detectar animales reactivos e incluso a portadores asintomáticos pudiendo ser de gran utilidad en el diagnóstico fácil, de confirmación rápida, específica y temprana de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué importancia tendría la identificación de anticuerpos frente *Leptospira interrogans* en muestras de suero sanguíneo por MAT y la presencia *Leptospira interrogans* en orina por PCR en animales domésticos?

OBJETIVOS

General:

- Detección de anticuerpos frente *Leptospira interrogans* en muestras de suero sanguíneo por MAT y *Leptospira interrogans* en orina por PCR de animales domésticos.

Específicos:

- Detectar la presencia de Anticuerpos frente a leptospiros mediante la técnica del MAT cualitativo.
- Tipificar los serovares de *Leptospira* encontrados en las muestras de suero mediante la técnica del MAT cuantitativo.
- Determinar la presencia de *Leptospira Interrogans* por PCR en muestras de orina de animales domésticos.

MARCO TEÓRICO

¿QUÉ ES LEPTOSPIROSIS?

La leptospirosis es una enfermedad común a los animales y al hombre, causado por diversos serovares de leptospiras que aparecen en la mayoría de los animales domésticos y silvestres, además de ser una zoonosis importante. La enfermedad causa septicemia, nefritis intersticial, anemia hemolítica y aborto en la mayoría de las especies, pudiendo provocar oftalmia periódica en equinos [39]. Los síntomas se presentan según el curso de la enfermedad, especie y categoría animal [40]. Es una enfermedad que resulta de la invasión por una de las cepas patógenas de *Leptospira* y se favorece en los climas tropicales y cálidos, y las zonas húmedas.

Es también conocida como Ictericia infecciosa, fiebre de los pantanos, enfermedad de Weil, reinguera, enfermedad de Stuttgart, enfermedad de las ratas, orina roja de los terneros, fiebre canícola, ictericia espiroquética, entre otras [40].

ETIOLOGÍA

Características y morfología:

Las *Leptospiras* son organismos delgados, difíciles de observar en un microscopio de luz corriente. Son en forma de espiral 6-20 μm de largo y 0.1 μm de diámetro, con una distancia promedio entre crestas consecutivas de unos 0.5 μm . Por lo general, uno o ambos extremos del organismo están curvados en forma de gancho. Por ser tan delgadas, son bacterias que se visualizan con mayor facilidad con un microscopio de campo oscuro. Son organismos aerobios obligatorios, móviles por el uso de filamentos axiales llamados axostilo y se dividen por fisión binaria. En virtud de su estructura en espiral alrededor de su eje axial, puede haber hasta 20 enrollamientos en función de su longitud total. La capacidad de invadir tejidos está también facilitada por la producción de la enzima hialuronidasa, que altera la permeabilidad del tejido conjuntivo al hidrolizar el ácido hialurónico [9].

Son bacterias Gram negativas, consistiendo en una membrana citoplasmática y otra externa. Sin embargo, la capa de peptidoglicano está asociada con la membrana citoplasmática en vez de la membrana externa, algo que es único de las espiroquetas. 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 [40].

TAXONOMÍA

El grupo científico de la OMS sobre leptospirosis en 1962 y el subcomité de taxonomía de la *Leptospira* en 1963, recomendaron que se reconocieran dos especies: *L. Biflexa*

(representada por las cepas saprófitas) y la *L. Interrogans* (representada por las cepas patógenas). El serovar es la unidad taxonomía básica y está representada por una cepa de referencia. Las bases para la clasificación de las leptospiras en serotipos las constituyen las diferencias tecnológicas reveladas por las reacciones de aglutinación con sueros preparados en conejos. El serogrupo, no es una subdivisión taxonómica; tiene un valor práctico para seleccionar los antígenos y antisueros, respectivamente necesarios para el examen sistemático de sueros y gérmenes aislados y, por consiguiente, para el diagnóstico e investigaciones [40].

En 1987 el Dr. Jorge Mazzonelli, experto del Centro Panamericano de Zoonosis de la OPS planteó que la unidad taxonómica básica (taxón Básico) anteriormente llamado serotipo actualmente se le llama serovar, es una denominación intrasubespecífica, es decir, que es incorrecto referirse a *Leptospira pomona* porque se le asigna una categoría de especie a una sub-específica, lo correcto es *Leptospira interrogans* serovar pomona. Mientras el serovar es el taxón base, el serogrupo es un ordenamiento que solo tiene fin didáctico, es decir que en la clasificación real no aparece, solo existe el serovar, agrupándose en los serogrupos, leptospiras con similitud antigénica entre ellas.

Clasificación taxonómica

División: Procariotes.

Clase: Schizomicetes.

Orden: Spirochaetales.

Familia: Leptospiraceae.

Género: *Leptospira*.

Especies: *L. interrogans*, *L. biflexa* [62]

Tabla 1. Especies de <i>Leptospira</i>	
Patógena	Saprophytas
<i>L. Interrogans</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. parva</i>
<i>L. santarosai</i>	
<i>L. alexanderi</i>	
<i>L. kirschneri</i>	
<i>L. meyeri</i>	
<i>L. fainei</i>	
<i>L. weilii</i>	
<i>L. inadai</i>	

Fuentes: Holt, J.G. Baltimore, USA, 1994.

RESISTENCIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Las Leptospiras son microorganismos que dependen ampliamente de las variaciones del pH del suelo y de las condiciones ambientales ya sea temperatura o humedad relativa. Son muy sensibles a la desecación, luz solar, pH ácido y alcalino, ya que un pH menor que 6 o mayor que 8 tiene carácter inhibitorio sobre el microorganismo. Una temperatura ≤ 13 °C o ≥ 35 °C provoca la muerte rápidamente [39]. Además, existen distintas sustancias químicas de carácter leptospiricidas: fenol al 5 %, alcohol al 70 %, formol al 2%, ácido clorhídrico 2%, emulsión de creolina al 5%, soda cáustica al 2%, durante 5 minutos, solución al 0,05 % de ácido sulfúrico, en 5 minutos. Son muy sensibles a la solución hipertónica de sal común (2,8%), bilis, putrefacción y a la mayoría de los antibióticos in vitro o in vivo como la penicilina, estreptomycin, aureomicina y los grupos macrólidos [41, 42, 43]. Sensible también a una temperatura de menos 70°C en nitrógeno líquido.

Si la orina de por sí, tiene una reacción ácida las Leptospiras presentes en ellas, pronto sucumben. Esta probabilidad es la principal razón por la cual la orina humana no disemina la infección y la orina de ratas, mientras no sea diluida, no tiene mucho riesgo [41]. Pero las leptospiras viven más de 16 días en orina débilmente básica como: del cerdo, vaca y equino durante diferente período, sin embargo, en orina ácida (carnívoros) mueren rápidamente.

Para la supervivencia en el medio ambiente necesita una humedad alta del suelo, una temperatura de 25°C, con agua de un pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de materia orgánica [44].

Las Leptospiras son resistentes al ácido nalidíxico, propiedad que puede utilizarse en la elaboración de medios de crecimiento para controlar la proliferación de otros microorganismos. Además, no incorporan el 5-fluorouracilo del medio, por lo que puede añadirse a los medios para el aislamiento a partir de muestras patológicas [44].

ESPECIES SUSCEPTIBLES

Las especies de mayor importancia económica son: bovinos, equinos, cerdos, ovejas y cabras; también afecta en mayor o menor grado a otros animales domésticos y salvajes como: perros, gatos, venados, mofetas, mapaches, zuriñueyas, musarañas, nutrias, canguros, mangostas, murciélagos, peces, reptiles, ranas, conejos,, zorros, erizos, chacales , nonatos, ratas y ratones, etc. [39, 43] y por último contribuye una zoonosis.

Tabla 2. Especie animal y serovares que lo afecta	
Especie animal	Serovares
Bovinos	grippotyphosa, pomona, icterohaemorrhagiae.
Porcinos	autumnalis, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa.
Perro	Icterohaemorrhagia
Caballo	Pomona
Ciervo	Hardjo

Fuentes: Heath S.E. and Johnson, 1994.

FUENTES DE INFECCIÓN

La principal fuente de contagio para el hombre constituye, la orina de animales enfermos, reservorios naturales así como el contacto directo con estos animales. También las aguas contaminadas, leche cruda, descarga vaginal, feto de animales infectados y fetos abortados etc. Siendo considerada como enfermedad profesional en granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos, médicos de inspección de carne, trabajadores de control de roedores.

Para los animales, constituye la orina de animales infectados, asintomáticos y portadores; también el agua, leche, forrajes, pastos, tejidos de animales, descargas posparto, saliva, semen, instrumentos quirúrgicos así como vectores siendo los roedores (ratas y ratones) los más importantes por su condición de reservorio natural [41, 42, 44, 46]. Algunos autores han considerado las garrapatas, aves e insectos como; moscas, mosquitos, etc. [41].

SINTOMATOLOGIA

El período de incubación generalmente es de 2-30 días y en ocasiones puede ser de 5-14, los síntomas son muy variables, dependiendo de la especie animal, el serovar infectante, la virulencia del germen y la inmunidad del hospedero [47].

HUMANO: Las manifestaciones van desde infección subclínica (común en veterinarios y cuidadores de animales), o un cuadro anictérico leve que ocurre en la mayoría (90-95 %) hasta una forma ictérica severa llamada enfermedad de Weil en un 5-10 % de los casos.

Forma Anictérica: Esta fase siempre se presenta de forma brusca suele durar una semana con signos: fiebre, cefalea, escalofríos, postración, mialgias, náuseas o vómitos, dolor abdominal, diarrea, artralgia y a veces meningitis aséptica [39].

Forma Ictérica: Es la forma más severa de la enfermedad. Entre sus síntomas, se pueden mencionar: irritación conjuntival, insuficiencia renal, ictericia, manifestación hemorrágica intestinal o pulmonar, arritmia o insuficiencia cardíaca y a veces hemorragia generalizada.

BOVINO: Cursa con hemoglobinuria, postración, anorexia, fiebre, anictérica, abortos en vacas jóvenes y esporádicos y el animal puede curarse posteriormente.

Sobreaguda: Se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, hemoglobinuria, ictericia [46], disnea por congestión pulmonar [48], anorexia, [42, 46, 45]. Generalmente, acaba con la muerte del animal en 3-5 días, siendo los terneros los más afectados; aunque en hembras preñadas provoca aborto por la pirexia y la desaparición prácticamente de la producción láctea (síndrome de la caída de la leche) [42]. Los serovares que más causan esta forma son: *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. autumnalis*, por lo que nunca se producen el portador crónica; por ser clasificado como serovares no adaptados [48].

Aguda: Es frecuente en los terneros, casi siempre mortal. Presenta: anorexia, laxitud, fiebre, 40,5-41,5°C, posteriormente se presenta la hemoglobinuria, ictericia, septicemia, hemorragias petequiales en todas las membranas mucosas, anemia [39, 47]. Al principio, se puede presentar diarrea, en algunos casos sanguinolentas y/o amarillentas y con olor fétido, pero más tarde puede haber estreñimiento, rara vez afecta a los adultos.

Subaguda: Lo mismo que la forma aguda pero de menos severidad, puede ser subclínica excepto en los animales gestantes y/o en lactación, en los que pueden aparecer abortos y síndrome de la caída de la leche [42] y a veces la leche parece contener coágulos de sangre y el recuento de sus células blancas son muy altos [47]. El aborto puede ocurrir de 3-4 semanas después de la infección [43].

Forma crónica: Casi siempre está relacionado con *L. hardjo* y en algunos casos *L. pomona* sin manifestación clínica [39, 47]. Caracterizada por la aparición de abortos, retención de placenta, mortinatos, nacimientos de animales débiles [42, 46]. El aborto puede ocurrir en esta última etapa de la gestación entre 6-9 meses y el animal elimina el germen por la orina durante un largo período [47].

CERDO: La mayoría de los casos es inaparente o subclínica. Presenta síntomas como: anorexia, perturbación del equilibrio, ictericia, hemoglobinuria, convulsión, trastornos gastrointestinales, parálisis progresiva, disminución del peso y producción láctea [53, 48]. La forma crónica es la de más connotación en esta especie por presentar: aborto, nacimiento de crías débiles, infertilidad [39, 47] casi siempre provocado por *L. pomona*.

OVINO – CAPRINO: Las epizootias en estas especies son muy raras, especialmente en el caprino. Muchos de los animales afectados aparecen muertos, aparentemente por septicemia [55]. Animales enfermos presentan: fiebre, anorexia, disnea, ictericia, hemoglobinuria, palidez de las mucosas, infertilidad, nacimiento de crías débiles o muertos y aborto [54]. Pueden presentarse forma crónica con pérdida de la condición corporal, pero el

aborto parece ser una manifestación exclusivamente asociada a la forma aguda de la infección por los serovares *pomona* y *hardjo*.

CANINOS (PERRO Y GATO): Los síntomas son variables, desde la ausencia total de signos clínicos hasta un síndrome icterohaemorrágico casi ausente en gatos, con la instalación repentina de hemorragia con fiebre de 3-4 días, seguida por rigidez y mialgia en miembros posteriores, hemorragia en la cavidad bucal con tendencia a necrosis y faringitis. En una etapa posterior puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. En la forma subaguda o crónica se desarrolla vómito, inapetencia, postración y anemia debido al fallo renal progresivo [47].

EQUINO: En esta especie, los síntomas son variables y en la mayoría de los casos la enfermedad cursa de modo asintomático aunque puede producirse fiebre, ictericia, hemoglobinuria, necrosis de la piel y los labios, conjuntivitis con edema en los párpados, lagrimeo y fotofobia donde se puede observar hepato-nefritis, muchas veces se presenta abortos en el último tercio de la gestación. La oftalmia periódica está considerada como una complicación de la Leptospirosis y se caracteriza por iridociclitios.

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico epidemiológico

Se debe enfatizar en las anamnesis de los aspectos siguientes:

En la época del año en la que ha aparecido el brote, principalmente en climas húmedos y precipitaciones, la aptitud del rebaño, manejo y estado sanitario, control de otras especies domésticas (perros, cerdos, ovejas, etc.) y animales silvestres potencialmente portadores, antecedentes de leptospirosis y si existe un programa de vacunación contra la Leptospirosis.

Diagnóstico clínico

Tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que presenten los animales y el humano [46, 48].

Diagnóstico de laboratorio

Las muestras de animales vivos utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad son sangre y leche en la fase aguda; y orina en la fase crónica. De los fetos, los órganos de elección son: hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno [46]. Los animales muertos y sacrificados, las muestras que se deben enviar son: cerebro, médula espinal, LCR y ojo cuando hay síntomas nerviosos, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (hígado, riñón, bazo etc.) [46, 47] y la vejiga y su contenido, humor acuoso, aborto y contenido estomacal. Las muestras postmortem más adecuada son: riñón (parte cortical), hígado, bazo, así como sangre de corazón o líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido peritoneal, cerebro, fetos abortados, semen y leche materna, deben preservarse congelados en glicerol a partes iguales.

El diagnóstico debe basarse en el conocimiento de la patogenia del microorganismo, así como de sus propiedades. Estos métodos se pueden dividir en:

- **TÉCNICAS INDIRECTAS**

Los métodos serológicos nos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección. El mayor problema que presenta son los niveles de anticuerpos, aunque se mantengan durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectados crónicamente que no siempre se detectan, además en los casos de infección por serovares adaptados un porcentaje de los animales pueden no presentar respuestas con anticuerpos [46].

A) MAT.

Es el método serológico de referencia; técnica que fue ideada por Martin en 1917 y Pettit 1918 quienes lograron describir el fenómeno de aglutinación y lisis con suero; a partir de esa fecha este método ha sido modificado y mejorado por distintos autores tales como: Schüffner y Mochtar, 1926 Borg-Peterson y Fagroeus 1949. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de sospechosos o enfermos (humanos y animales) donde el suero del paciente sospechoso o enfermo reacciona con antígenos vivos de leptospiras de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente [46, 45, 49].

Para obtener una adecuada sensibilidad, se recomienda utilizar cepas representativas de todos los serogrupos presentes en un lugar determinado concreto y de la especie objeto de estudio [49]. También hay reportes de una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92 % y 95 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100 %.

Es necesario determinar el punto de corte, título por debajo del cual es considerado que la aglutinación es debido a reacciones inespecíficas. El punto de corte más recomendado para Nicaragua para confirmar casos de Leptospirosis en animales es el título 1:400, ya que en diluciones menores el 90% de las muestras de suero de los animales resultan positivas a la prueba [50].

Al igual que otras pruebas serológicas, para diagnosticar una infección individual mediante MAT, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 7-14 días de intervalo de la primera y si se observa que ha habido seroconversión, se considera de valor diagnóstico un cambio en el título de al menos, cuatro veces el título inicial [50]. Es una prueba principalmente de rebaños, pues la obtención de títulos individuales frente a las leptospiras, se considera poco significativo [46, 50].

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacunales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva [43, 45], requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras [43] y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico [43, 45].

Para llevar a cabo MAT es necesario utilizar cultivos de 4-8 días, ya que esto nos permitirá obtener resultados más confiables y no tendremos títulos por debajo, lo cual, se debe a reacciones específicas.

B) Prueba de Aglutinación Microscópica con Antígeno Muerto (MSAT)

Utiliza leptospiras formoladas y centrifugadas, resuspendidas a una cierta densidad estándar, con un "pool" de antígenos de varios serogrupos. La aglutinación que se produce es semicuantitativa y puede leerse a simple vista. Esta reacción es menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido, mayor reacción cruzada, los antígenos son estables a 4°C por lo menos un año, es especie específica y de la misma forma que MAT, no diferencia reacción entre anticuerpos de la infección reciente y tardía, pero tiene una buena reacción temprana de la enfermedad que MAT.

C) Fijación del Complemento (FC)

Es una prueba género-específica que emplea como antígenos de *L. biflexa*, considerada tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospirosis, pero, detecta infección reciente, es útil en la pesquisa de grandes cantidades de sueros ya que puede semiautomatizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anti complementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos [49].

D) ELISA:

Esta técnica puede detectar anticuerpos tanto en tanque de leche [48] como en el suero. Es capaz de detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad y la detección tardía de IgG que permite diferenciar infecciones recientes de pasadas. La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente por leptospiras. Se considera como más sensible que MAT [43], es fácil de estandarizar los antígenos, pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos y pocas reacciones cruzadas, tampoco diferencia los anticuerpos vacunales de las infecciones [43]. A pesar de que es una prueba muy eficaz, aún no está considerada como prueba oficial.

E) Aglutinación macroscópica

Pocos autores la recomiendan debida a su falta de sensibilidad y porque no es capaz de determinar el serovar [49]

F) Aglutinación en microcápsula

Se utiliza antígeno leptospiral transportado en microcápsulas de un polímero sintético. Los autores la consideran como una prueba muy específica y sensible [51]. En una evaluación internacional fue más sensible que MAT o ELISA-IgM en la fase aguda de la enfermedad, pero no puede detectar infecciones causada por otros serovares [51]. Se puede trabajar sin la modificación del suero de otras especies animales.

G) Hemoaglutinación indirecta (HA)

Es una prueba serológica género-específica de alta sensibilidad y solamente detecta las IgM. Utiliza eritrocitos de ovejas o del grupo sanguíneo O humano. A pesar de que siempre se ha considerado de utilidad, no ha llegado a desplazar al MAT y de hecho, se utiliza de manera paralela a él. Resulta de valor para la detección de infecciones recientes. Tiene una sensibilidad y especificidad de 92 % y 95 % comparado con MAT respectivamente. Por estos altos valores en el territorio cubano es la técnica elegida para el diagnóstico de Leptospirosis humana.

TÉCNICAS DIRECTAS

A) Observación en microscopio de campo oscuro

Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos. Es difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión [48]. Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras [48, 44, 46].

B) Tinción Argéntica:

Dentro de este grupo podemos considerar diferentes técnicas, como: la técnica de Warthing-Starry y sus modificaciones y la técnica de Steiner y Steiner. Se utiliza para la demostración de Leptospiras en los órganos de animales presumiblemente muertos por leptospiras [50]. La presencia de leptospiras en fetos abortados y mortinatos son indicadores claros de que es una infección activa en el feto y crónica en la madre, considerando de valor diagnóstico [50]. Además de su baja especificidad y sensibilidad [50], presenta las mismas inconveniencias que la anterior.

C) **Técnicas de tinción Inmunohistoquímica:**

Tienen baja sensibilidad, por lo que son poco adecuados para el diagnóstico de portadores crónicos, lo que depende del número de microorganismos en la muestra [50]

- **Inmunofluorescencia:** Es más adecuada para la detección de leptospiras que las anteriores [49]. Casi siempre se utiliza en el diagnóstico para los casos de abortos [49, 44] y de la presencia de Leptospiras en sedimentos de orina [44]. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia. [49]

- **Inmunoperoxidasa:** Es más rápida y asequible que la anterior ya que no precisa de un microscopio de fluorescencia [49].

- **Marcado de partículas de oro:** Al igual que las anteriores, depende del número de microorganismos y poco sensible [46].

D) **Aislamiento y estudio de ácidos nucleicos**

Son pruebas modernas que aun precisan más estudios sobre su efectividad y utilidad. Comprende: marcado con sondas de ADN, hibridación de ARN, marcado con radio y PCR con mayor efectividad en la orina [51].

E) **Aislamiento**

Para muchos autores, es la técnica más sensible para el diagnóstico de leptospiras, además es la que confirma la presencia del germen, tanto en casos agudos como crónicos [43, 49, 50, 44], a pesar de que requiere mucho tiempo y de laboratorios especializados [43,46].

La inoculación en animales de experimentación puede considerarse una forma especial del aislamiento y está considerada como la técnica más sensible por algunos científicos [44].

También existen otros métodos pero no de amplio uso en el mundo como: Prueba Hemolítica (HL), Contraelectroforesis (CIE), Inmunoabsorción Magnética, Hibridación de ADN., Absorción de antígeno inmunomagnética etc.

F) **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis [52], cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; a partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida.

Fundamento e importancia

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas [53].

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent) [54].

Actualmente el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico.

La PCR es una técnica común y normalmente indispensable en muchos laboratorios de investigación médica y biológica en varios países para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas. Sin embargo, en Nicaragua en la actualidad no se ha trabajado a profundidad como método de diagnóstico en laboratorios veterinarios [61, 62].

OPTIMIZACIÓN DE LA PCR

En la práctica, la PCR puede fallar por varias razones, entre ellas:

1. La PCR es una técnica de gran sensibilidad, es decir, necesita una mínima cantidad de ADN para obtener un gran número de copias, así que puede ser propensa a errores en

condiciones inadecuadas de esterilidad, que conduzcan a la amplificación de ADN no correspondiente a la muestra a analizar (y por tanto a conclusiones inciertas). La contaminación con ADN extraños puede solucionarse con protocolos y procedimientos que separen espacialmente distintas etapas, y la limpieza exhaustiva de la superficie de trabajo entre la realización de una PCR y la siguiente.

2. Las técnicas de diseño de cebadores son importantes en la mejora de la obtención de productos de PCR y en evitar la formación de productos falsos.

INHIBIDORES DE LA PCR:

La PCR es una técnica que brinda innumerables ventajas; su capacidad de multiplicar la porción del ADN buscada (alta sensibilidad), la utilización de cebadores que reconocen una secuencia única elegida, propia de cada microorganismo (gran especificidad) así como su rapidez comparada con algunas técnicas tradicionales. Al mismo tiempo a pesar de sus grandes ventajas podemos ver que existe gran probabilidad de obtener resultados falsos positivos por contaminación con productos de amplificaciones anteriores (amplicones) lo que hace necesario realizar una cuidadosa evaluación de sus resultados así también la estandarización de la técnica con el propósito de obtener resultados confiables.

La presencia de sustancias endógenas que se encuentran en la orina pueden inhibir la PCR, por lo que es necesario un adecuado procesamiento y mantenimiento de la muestra de orina [36]:

1. La DNA de Taq polimerasa puede ser inhibida por diversos factores, iones libres de magnesio, la hemoglobina, sales biliares, los polisacáridos ácidos de las glicoproteínas y extremas variaciones de pH; el fenol y cloroformo, que a menudo es utilizado para la extracción y purificación del ADN, también son considerados como inhibidores.
2. La Leptospira es sensible al ácido a pH: 6.8 o menos de 6, por lo que en orinas con medios ácidos se observa amplificación de leptospiras.
3. La presencia de células epiteliales, leucocitos y cristales disminuye la sensibilidad.
4. La congelación y descongelación de las muestras de orina antes del proceso ha dado resultados negativos en la detección de Leptospira por PCR.
5. Algunas bacterias se lisan durante el almacenamiento de la orina y, en consecuencia, su ADN se puede perder con el sobrenadante después de la centrifugación para concentrar los microorganismos.

ESTRATEGIAS QUE PUEDEN TOMARSE EN CUENTA PARA LA DETECCIÓN DE LEPTOSPIRAS EN ORINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR:

1. Centrifugar las muestras de orina a 3.000 rpm a temperatura ambiente para eliminar células epiteliales, leucocitos y cristales presentes en orina.
2. Agregar una etapa de lavado con agua destilada después de recoger las leptospiras por centrifugación y antes de hervir.
3. La neutralización de la orina inmediatamente después de su recolección, para evitar la pérdida de ADN en el paso de lavado; se utilizan diferentes soluciones Tris 1M o NaOH 0,2 siendo el tampón fosfato- solución salina (PBS) el que da mejores resultados.
4. Según trabajos en la detección de *Leptospira* por PCR en muestras de orina humana la inclusión de albúmina sérica bovina al 0,1% en la mezcla de reacción minimiza la interferencia de otros compuestos inhibidores y también aumenta la estabilidad en la solución de Taq ADN polimerasa.
5. Congelación de la orina: las muestras de orina que van a ser probadas por PCR para la detección de leptospiras tienen que ser neutralizados y lavarse antes de su almacenamiento a -20 ° C; en el caso de las muestras no se procesen en el mismo día, pueden ser almacenados a 5 ° C hasta el día siguiente, después de la neutralización [37].

APLICACIONES:

La técnica de la PCR tiene diversas aplicaciones: ya en ciencia básica, como herramienta de detección y/o generación de conjuntos de fragmentos de ADN de interés o como ciencia aplicada, como elemento resolutivo en sí mismo, por ejemplo en diagnóstico clínico.

Investigación

La PCR convencional se emplea como base para multitud de técnicas en el laboratorio debido a su robustez y rapidez. De este modo, la PCR de punto final permite controlar y detectar los fragmentos de ADN de interés.

Una aplicación de la PCR de extrema importancia es la clonación de secuencias de ADN en vectores, como pueden ser los plásmidos. Para ello, se emplean cebadores que contienen en su extremo 5' una corta secuencia que permite la interacción posterior con otra complementaria situada en el vector de clonación a emplear [54].

Medicina

En medicina, la PCR se emplea fundamentalmente como herramienta diagnóstica [55]:

- Permite el genotipar la especie o especies que provocan un determinado cuadro infeccioso: amplificando una zona del genoma bacteriano cuyo producto de PCR posea unas características de tamaño o temperatura de fusión que permitan identificarlo de forma inequívoca [56].

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Es necesaria una buena anamnesis que abarque los antecedentes particulares y/o animales patológicos de 15-20 días anteriores a la presentación de la enfermedad.

Bovinos: Se deben diferenciar con cuadros que cursan con: hemoglobulinuria, hematuria, hemólisis, aborto, mamitis y disminución de la producción láctea como: Anaplasmosis, Babesiosis, Pasteurellosis, Brucelosis, Listeriosis, Vibriosis, Trichomoniasis, Toxoplasmosis, Intoxicación por cobre, Hemoglobulinuria posparto [39, 49] y trastornos alimentarios.

Ovino-caprino: Similar al bovino.

Porcino: Brucelosis, Peste porcina, Aujeszky, Listeriosis, Salmonelosis, SMEDI virus, Parvovirus porcina, Encefalitis viral japonesa, Erisipela porcina, deficiencia nutricional, etc. [49, 39]

Equino: Anemia Infecciosa Equina, Salmonelosis, Babesiosis, Tripanosomiasis, Artritis viral equina, Rinoneumonitis viral equina y la causada por streptococcus genitalium [39].

Canino: Hepatitis canina, trastornos gastrointestinales.

Humano: Dengue, Malaria (paludismo), Influenza, Hepatitis viral, Fiebre hemorrágica epidémica, Hantavirus, Septicemia con ictericia, Fiebre Q, tífus, Brucelosis, Borreliosis, Toxoplasmosis, Fiebre Amarilla, Piolonefritis, Gripe, Síndrome de disfunción orgánica múltiple.

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio:

Es de tipo descriptivo de corte transversal.

Cepas de leptospiras:

Se usaron 30 cepas de referencia internacional (Instituto Royal, Holanda) (**Anexo 1**). Las leptospiras se subcultivaron semanalmente a 30°C en medio EMJH previamente descrito por Jhonson y Harris [29].

Tamaño de la muestra:

Se recolectaron muestras de 62 animales domésticos (62 muestras de orina y 56 muestras de suero sanguíneo) provenientes de diferentes localidades de distintos municipios de Nicaragua.

Selección de las muestras:

Las muestras fueron tomadas de animales que convivían en casas o fincas donde se diagnosticaron casos positivos de leptospirosis en humanos del occidente del país confirmados laboratorialmente por el sistema de vigilancia del Ministerio de Salud (MINSa). La selección de las casas o fincas fue por conveniencia y los animales fueron seleccionados aleatoriamente.

1. Criterios de Inclusión:

- Animales de casas o fincas con casos de humanos positivos confirmados laboratorialmente por el MINSa.
- Consentimiento de los propietarios de los animales en la participación en el estudio.
- Animales domésticos (caninos, bovinos, equinos y porcinos) mayores de 3 meses de edad.

2. Criterios de Exclusión:

- Viviendas donde no se diagnosticaron casos de leptospirosis laboratorialmente.
- Indisposición de participar en el estudio.
- Animales de otras especies y menores de 3 meses.

Toma de muestras:

Para la recolección de orina, se les administró con anticipación a los animales una dosis de diurético a razón de 2.5 mg/kg de peso, por vía endovenosa y se esperó un tiempo de 5 minutos. Posteriormente se procedió a realizar la toma de la muestra por cistocentesis con jeringas estériles en caninos y porcinos, y por estimulación directa en bovinos y equinos. Recolectándose aproximadamente 3 ml de orina que fueron depositadas en un tubo cónico de 15 ml con o sin EMJH+5'Fluorouracilo.

Para la toma de sangre se realizó punción venosa, en cerdos (vena cava), caballos (vena yugular) y caninos (vena radial); en el caso de los bovinos se extrajo a partir de las arterias coccígeas.

Conservación de las muestras:

Las muestras de orina fueron conservadas en medios de cultivos EMJH+5fu e incubadas a una temperatura de 30°C. [29]

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, depositando el suero sanguíneo en microviales de 1,5 ml para su análisis o almacenadas a -20°C.

Serología

Las muestras de suero de pacientes se analizaron mediante el método de referencia de MAT en la que se emplearon 11 serovares de leptospiras como antígenos vivos (**Anexo 1**) de acuerdo a lo recomendado por la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OMS/OPS) y la OIE [30]. Se consideraron casos confirmados de leptospirosis los sueros con título de anticuerpos mayor o igual a 1:400.

Detección directa de leptospiras a partir de muestras de orina

Extracción del ADN:

Las muestras de orina con o sin EMJH+5'Fluorouracilo fueron centrifugadas previamente a 12000 rpm x 20 minutos, extrayendo el sobrenadante y lavando dos veces con agua destilada estéril (100 µl); se realizó una segunda centrifugación a 12000 rpm x 20 minutos y se calentó a 96°C x 10 minutos. Luego se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Reactivos

Para realizar la técnica se necesitan [54]:

1. Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN.
2. Los cebadores LipL21, oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN.
3. Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}).
4. Iones monovalentes, como el potasio.
5. Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
6. ADN polimerasa (polimerasa Taq).
7. ADN molde extraído de las muestras de orina.
8. Termociclador.

PCR:

La amplificación de la región LipL 21. Esta región corresponde a la segunda proteína en preponderancia relativa en la superficie celular de *Leptospira* sp, es un fragmento inmunogénico, útil para inducir una respuesta inmunitaria frente a especies patógenas de *Leptospira* y proporciona también una diana diagnóstica en la leptospirosis [28], esta proteína es específica para las *Leptospiras interrogans*. Se utilizaron los siguientes cebadores: forward: GGGGTACCAGTACTGACACAGGACAAAA y reverse: AACTGCAGACCTCTTGAGCTTTTGCTAC, tomando 2 μ l de la extracción de ADN de cada muestra, del control positivo (Especie, *Interrogans*, Serogrupo *Icterohaemorrhagiae*, Serovar *copenhageni*, cepa *Wijnber*) y 2 μ l de control negativo (Especie, *biflexa*, Serogrupo *Semarangae*, Serovar *patoc*, cepa *patoc 1*), se mezcló con 23 μ l de la solución madre conteniendo 12.5 μ l de Master Mix 2x (Fermentas), 1 μ l de los cebadores LipL21 (20 pmol, Invitrogen), y 8.5 μ l de agua libre de nucleasas (Fermentas) para un volumen final de reacción de 25 μ l. El programa se configuró en un termociclador (AppliedBiosystem 2720) a 30 ciclos en 94°C por 2 minutos, 55°C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos y al final una extensión de 72°C por 7 minutos, para obtener un producto de 507 bp y se reveló en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Luego de observar el gel en un transiluminador UV, una muestra se consideró positiva al revelarse la banda de 507 bp esperada con el iniciador LipL 21, y que el control negativo no revelara ninguna banda.

Análisis de los resultados:

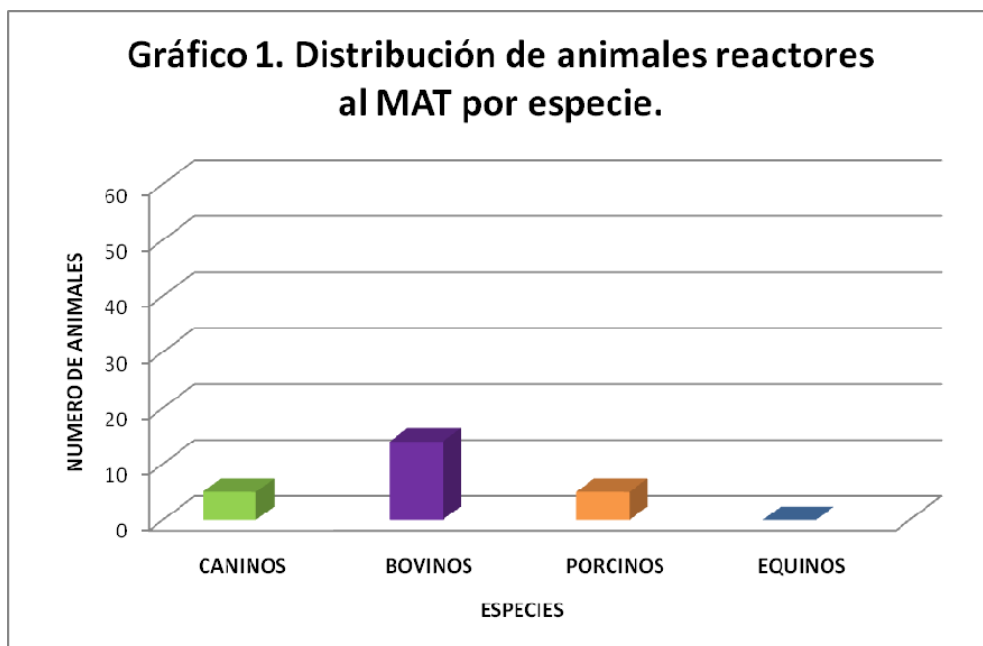
Para el análisis de los resultados se utilizó Microsoft Excel por medio de graficas de columna; comparando valores entre categoría; considerando como animales reactivos a leptospirosis por MAT aquellos con título mayor o igual a 1:400; y muestras positivas a PCR si amplificaron bandas de 507 bp con el primer LipL21 utilizado.

RESULTADOS

- **Serológicos:**

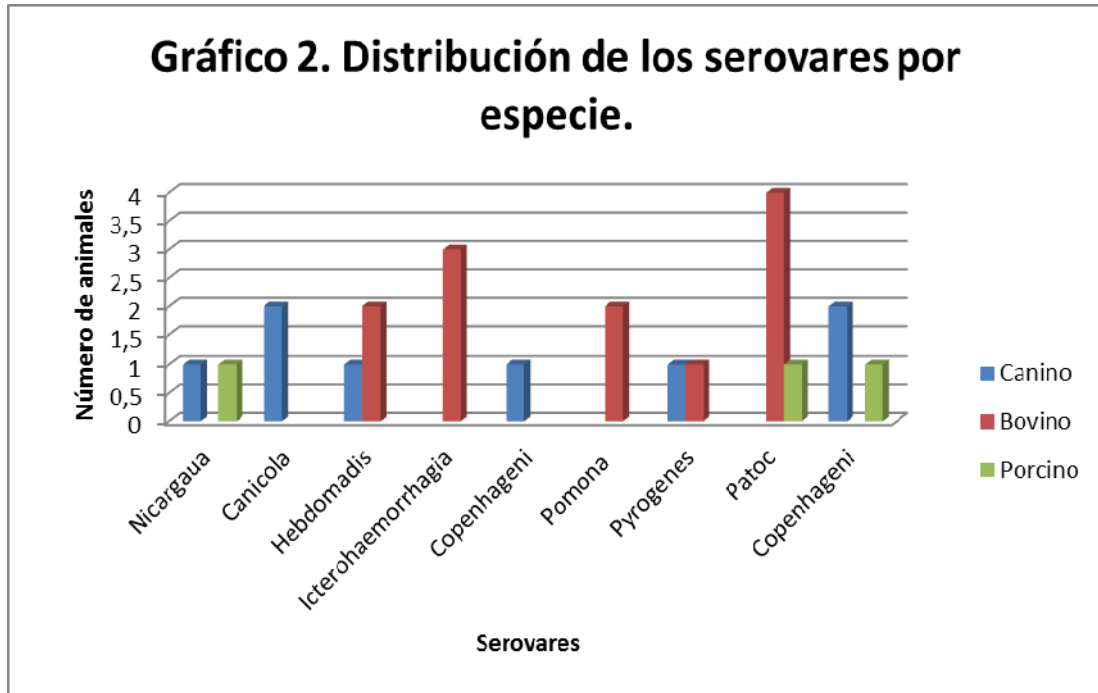
De las 56 muestras de sangre recolectadas en animales domésticos se obtuvo un 42.85% (24/56) de reactivos a leptospirosis y un 57.14% (32/56) de animales no reactivos a *Leptospira*.

La distribución de los animales reactivos se refleja en la siguiente gráfica (**Gráfica 1**).



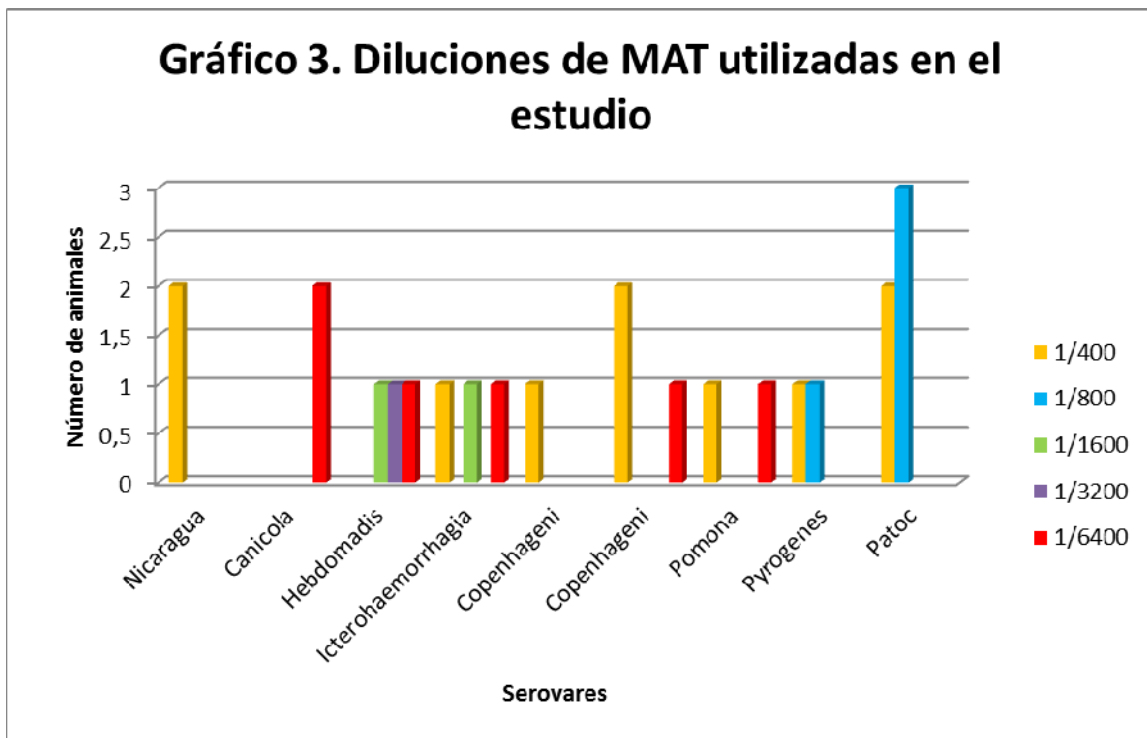
De los 24 animales positivos, se les realizó la prueba del MAT cuantitativo para la determinación del serovar, obteniéndose los siguientes resultados. Equinos no demostraron ser reactivos a *Leptospira*. (**Gráfica 2**)

Gráfico 2. Distribución de los serovares por especie.

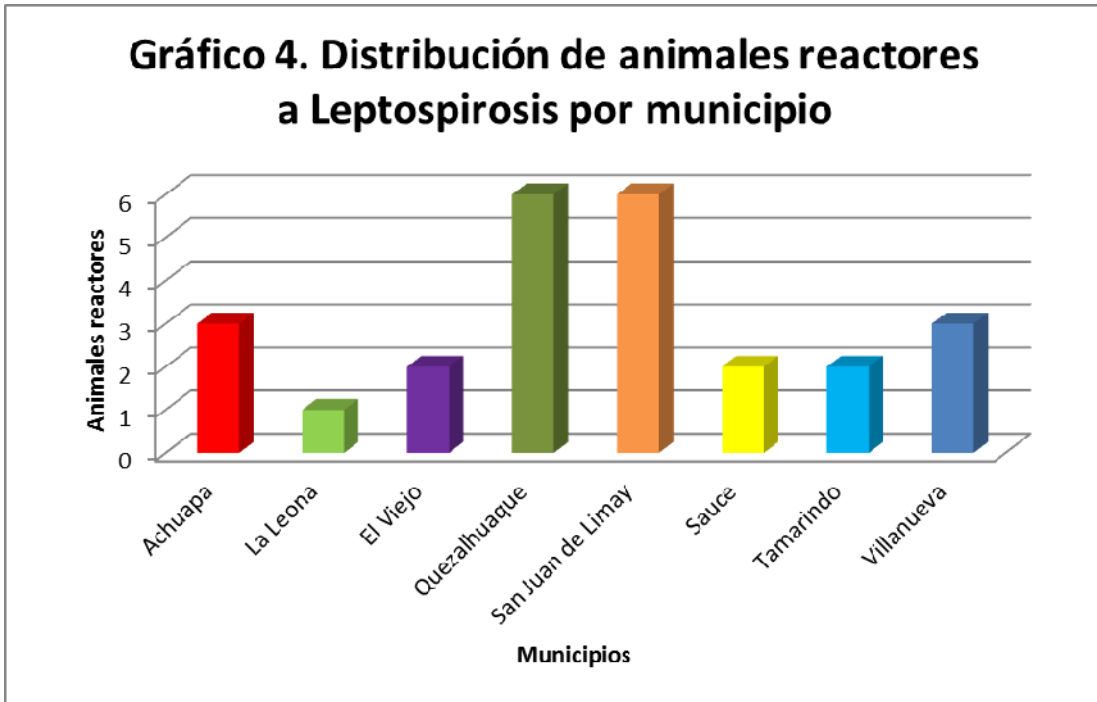


Para la tipificación de los serovares, se utilizaron diluciones de 1/400 hasta 1/6400, obteniéndose los siguientes resultados: **(Gráfico 3)**

Gráfico 3. Diluciones de MAT utilizadas en el estudio



La distribución de los animales reactivos por municipio se refleja en la siguiente gráfica **(Gráfica 4)**



- **Resultados del PCR:**

Con el fin de verificar la especificidad de los iniciadores, se examinó por PCR el ADN de las cepas de leptospiras patógenas y el de las no patógenas las cuales fueron utilizadas como controles (Control positivo: *Especie, Interrogans, Serogrupo Icterohaemorrhagia, Serovar copenhageni, cepa Wijnber* y control negativo *Especie, biflexa, Serogrupo Semarang, Serovar patoc, cepa patoc 1*). Al amplificar con el iniciador LipL 21 se observó una banda de 507 pb en la cepa del control positivo perteneciente a la especie de leptospiras patógenas, a excepción del control negativo perteneciente a la especie *L. biflexa*, las cuales no amplificaron con el iniciador LipL 21.

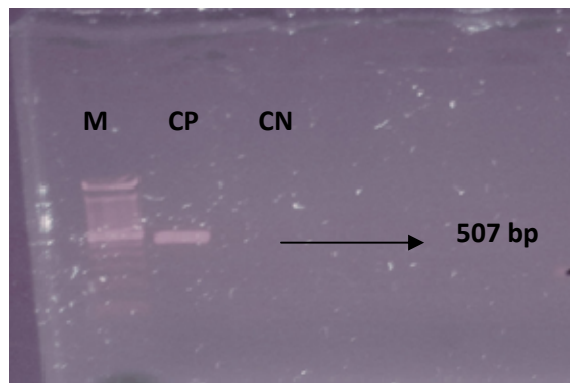


Figura 1. Productos de PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 507 bp. M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); CP: control positivo (cepa); CN: control negativo (cepa).

De las 62 muestras de orina colectadas de animales domésticos, ninguna resultó positiva a la técnica de PCR.

DISCUSION

El objetivo principal de este estudio fue la detección de *Leptospira interrogans* en muestras de sangre y orina de animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua mediante las técnicas de PCR y la prueba MAT, utilizada en la confirmación de casos, pues es considerada la prueba “Gold Standard” o de referencia [30, 31]

Basados en los estudios realizados en la detección de *Leptospira* por Salgado, Gabriela 2007 y Brand, Manuel et. al 2009 se observó una seroprevalencia de 56% y 35% respectivamente; los resultados de este estudio presentaron una seroprevalencia de 42.85% de 24 de 56 muestras de suero de animales domésticos, lo que demuestra que la enfermedad de leptospirosis es endémica en municipios del occidente de Nicaragua y San Juan de Limay (Estelí). En nuestro estudio se realizó un control de foco tomando muestras en casa/fincas con casos positivos confirmados en humanos, similar al estudio de San Juan de Limay, mientras que la diferencia entre la prevalencia encontrada en Leona puede ser debida a que el muestreo se determinó a un control de brote.

De la distribución de animales reactivos se obtuvo en Bovinos un 35.90%, porcinos 55.50%, caninos 41.67%, los resultados de nuestro estudio son más altos en la especie Bovina y Porcina que los reportados por Brand, Manuel et. al 2009 y Marin, Yamil 2008; a diferencia de la especie equina que en nuestro estudio ninguno demostró ser reactor al MAT pero en el estudio de San Juan de Lima, Sauce y Achuapa tuvieron un alto porcentaje de reactivos equinos 41.6% y 76% respectivamente; esta diferencia en los porcentajes puede ser debida al tamaño de la muestra de estudio, a diferencias de las zonas donde fueron tomadas las muestras ya que los Bovinos y Porcinos fueron las dos especies que se encontraron con mayor frecuencia en las casas/fincas para la toma de muestras.

Para la tipificación de los serovares se utilizaron diluciones de 1/400 hasta 1/6400; los 24 animales que dieron reactivos por la prueba de referencia MAT presentaron mayor número de animales reactivos frente a los serovares, obteniéndose los siguientes resultados: Bovinos serovar Patoc (titulación 1/400 y 1/800) e icterohaemorrhagica (titulación 1/400, 1/1600 y 1/6400); Porcinos serovar Patoc (titulación 1/400 y 1/800), Copenhageni (titulación 1/400) y Nicaragua (1/400); Caninos serovares Canicola (1/6400), Copenhageni titulación 1/400); equinos ninguno fue reactor a MAT. En el estudio Brand, Manuel et al 2009 se obtuvieron resultados similares a nuestro estudio; esto puede deberse a las características geográficas similares de las zonas muestreadas que favorezcan la presencia de la bacteria, así como características de manejo, los serovares encontrados en ambos estudios corresponden a lo de tipo específico de especie.

De los 8 municipios que fueron muestreados para este estudio, dos de ellos fueron los que presentaron más reactivos; Quezalhuatepeque y San Juan de Limay con 6 animales reactivos cada uno, seguido por Achuapa con 3 animales siendo La Leona el municipio el que obtuvo un animal reactor; como observamos existe una gran diferencia de animales que resultaron positivos por especies entre cada región esto puede deberse a la cantidad de animales que se

les tomó la muestra para luego estas ser seleccionadas al azar para el estudio, las diferencias de cada zona donde se realizó la toma de muestra así como las características de manejo que favorezcan la presencia de la bacteria, incluyendo además que existen hospedadores de mantenimiento y accidentales los cuales son distintos para cada región.

Han sido descritos diferentes iniciadores para la detección de leptospiras mediante PCR, algunos basados en secuencias génicas específicas [33, 34, 35]. En este estudio se utilizaron el iniciador LipL 21 que amplifica una secuencia específica de las especies patógenas *L. interrogans*, la PCR con el primer usado presentó una especificidad de 100% en muestras controles; sin embargo no detectó ADN de *Leptospira interrogans* en las 62 muestras de orina. Esta baja sensibilidad puede ser debida al efecto de agentes inhibidores en orina u otros factores capaces de inhibir la PCR, por lo tanto las muestras positivas puede pasar desapercibida debido a los resultados falsos negativos [36].

Según estudios realizados por Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil indica lo siguiente: **“Debido a las sustancias endógenas presentes en la orina puede inhibirse el PCR, algunas bacterias se lisan durante el almacenamiento de la orina y, en consecuencia, su ADN puede perderse con el sobrenadante después centrifugación para concentrar los microorganismos. La *Leptospira* es sensible al medio ácido (pH 6.8 o menor de 6) por lo tanto la muestra debe de ser neutralizada inmediatamente después de la recolección, para evitar la pérdida de ADN bacteriano en el paso de lavado. La presencia de células epiteliales, leucocitos y cristales del magnesio libre iones, la hemoglobina, las sales biliares, los polisacáridos ácidos de las glicoproteínas son también inhibidores por lo que deben de ser eliminados de las muestras para lograr las amplificaciones del ADN; así como El fenol y cloroformo, a menudo utilizado para la extracción y purificación del ADN, también son considerados como inhibidores”** [36], lo que confirma lo antes mencionado.

CONCLUSIONES

- Según los resultados obtenidos por medio de la técnica MAT cualitativo de las 56 muestras de suero tomadas de animales domésticos 24 presentaron anticuerpos frente a *Leptospira*, siendo reactivos a Leptospirosis.
- Mediante MAT cuantitativo pudimos tipificar los serovares de *Leptospira* de los 24 animales que dieron reactivos por la prueba de referencia MAT; presentaron mayor reactividad frente a los serovares Nicaragua cepa 1011, Canicola cepa Hond Utrecht IV, Hebdomadis cepa Hebdomadis, Icterohemorragia cepa RGA, Copenhageni cepa M20, Copenhageni cepa Wijnberg, Pomona cepa Pomona, Pyrogenes cepa Salinem, Patoc cepa Patoc 1.
- Mediante PCR no se pudo determinar la presencia de *Leptospiras Interrogans* en muestras de orina de animales domésticos, consideramos que la acción de agentes inhibidores en orina u otros factores fueron capaces de inhibir la PCR.

RECOMENDACIONES

- Para un diagnóstico exitoso de Leptospirosis en muestras de orina por PCR en animales domésticos es necesario tras colectar la muestra de orina, estas deben de ser sometidas a un correcto procesamiento y almacenamiento, eliminando agentes inhibidores en orina u otros factores capaces de inhibir la PCR.
- Las muestras de orina que van a ser procesadas por PCR para la detección de leptospiras, tienen que ser neutralizados inmediatamente después de su recolección y lavarse antes de su almacenamiento a -20°C , procurando que las muestras deban procesarse en forma rápida.
- Dar continuidad al estudio de PCR como una alternativa de diagnóstico de leptospirosis en animales domésticos procurando que las muestras deben procesarse con el protocolo adecuado para cada tipo de muestra para evitar la degradación de ADN.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CARDONA E, Marta Noelia, MOROS V, Rosalba María, LOPEZ L, Eneida Aurora et al. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [online]. jun. 2008, vol.28, no.1 [citado 08 Marzo 2011], p.24-30. Disponible: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S131525562008000100006&Ing=es&nrm=iso. ISSN 1315-2556
2. Faine, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. Faine S. (Ed.). WHO Offset Publication, 67. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
3. Ellis, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10 (3): 463-478, 1994.
4. Michna S.W.1970. Leptospirosis. Vet. Rec. 86, 484-496
- Perdomo, E. y Garin, A. 2002. Leptospirosis animal. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.24-26.
5. Ellis, W.A. 1986. The diagnosis of Leptospirosis in farm animals, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 13-31.
6. Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE; 1992.
7. Ellis, W.A., O'Brien, J. J. and Cassells J., 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in North Ireland. Vet. Rec. 108: 555-557.
8. Thiermann, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 184, 722-725. Faine, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. Faine S. (Ed.). WHO Offset Publication, 67. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Heath S.E. and Johnson, R. 1994. Leptospirosis. JAVMA 205, 1518-1523
9. Thiermann, A.B. 1983. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am. J. Vet. Res 44, 2244-2245.
- Thiermann, A.B. and Garret, L.A. 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887.
10. Thiermann, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 184, 722-725. Heath S.E. and Johnson, R. 1994. Leptospirosis. JAVMA 205, 1518-1523.
11. Baskerville, A.1986. Histological aspects of diagnosis of Leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 33-43.
12. Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE; 1996.
13. Ellis, W.A. 1986. The diagnosis of Leptospirosis in farm animals, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 13-31.
14. Timoney, J..F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. 1988. The Spirochetes, In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, 45-57.
15. Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8.
16. Bolin, C.A. 1989. Human to human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. J. Infect. Dis. 159:246-247.
17. Van Eys, G.J.J.M., Gravekamp, C., Gerritsen M.J., Quint, W., Cornelissen M.T.E., Terschegget, J., terpstra W.J. 1989. Detection of leptospires in urine by polimerasa chain reaction. J. Clin. Micorbiol. 27, 2258-2262.
18. Amplificación de DNA in vitro: PCR (Polymerase Chain Reaction)

19. Van Eys G J J M, Gravekamp C, Gerritsen M J, Quint W, Cornelissen M T E, ter Schegget J and Terpstra W J. Detection of leptospira in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(10):2258-2262.
20. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization (WHO). Geneva 1982.
21. GERRITSEN, M. J., OLYHOEK T., SMITS, M. A., BOKHOUT B. A. Sample Preparation Method for Polymerase Chain Reaction-Based Semiquantitative Detection of Leptospira interrogans Serovar. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [en línea], Dec. 1991, p. 2805-2808 [citado 08 de marzo del 2011]
Disponible: jcm.asm.org/cgi/content/abstract/29/12/2805
22. Gravakamp, C.; Van de Kemp, H.; Irazen, M. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139(8): 1691-1700, 1993.
23. Wagenaar, J.A.; Segers, R.P.; Vander, B.A. Rapid and specific detection of pathogenic leptospira species by amplification of ribosomal sequences. *Mol. Biotechnol.* 2(1): 1-14, 1994.
24. Bal, A.E.; Gravekamp, C.; Horts Keerl, R.A. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32(8): 1894-1898, 1994.
25. QUARESMA BOMFIM, Maria rosa, BARBOSA-STANCIOLI, Edel, COTA KOURY, Matilde. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet J.* 2008 Nov; vol. 178(2): pp. 251-656.
26. CESPEDES Z, Manuel, TAPIA L, Rafael, BALDA J, Lourdes, GONZALES Q, Dana et al. Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de leptospirosis humana. *Rev. Peru Med Exp Salud Pública* [en línea] 2007; vol.24, no.1 [citado 08 de marzo 2011], pp. 20-28
Disponible: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=36324104>
ISSN 1726-4642
27. MORENO, Natali, AGUDELO-FLOREZ, Piedad. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de Leptospira spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [en línea] Dic. 2010, vol.27 no.4 [citado 08 marzo del 2011], pp. 548-56. ISSN 1726-4634. doi: 10.1590/S1726-46342010000400009.
28. Johnson R C, Harris V G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. *J Bacteriol.* 1967; 94:27-31.
29. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization (WHO). Geneva 1982.
30. Sulzer C R, Jonus W L. Leptospirosis. .Methods in laboratory diagnosis. US Dept Health. Public Health Service. Center for Disease Control, HEW Publ N° (CDC) 78-8275. Atlanta 1976.
31. Costa O M, Ravara V A, Cota K. M. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods.* 2006; 65:247-57.
32. Hookey J V. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 69: 267-74.

33. Merien F, Baranton, G. Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis.* 1995; 172:281-85.
34. Barocchi M A, Ko A I, Ferrer S R, Faria M T, Reis M G, Riley L W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhaneni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 191-95.
35. Lucchesi Paula, Arroyo Guillermo, Etcheverria Analía et al. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(2):131-134, mar-abr, 2004.
36. Hernandez, Yenney (2008): Estandarización de la PCR y generalidades. Monografías.com. <http://www.monografias.com/trabajos53/generalidades-pcr/generalidades-pcr.shtml>
37. VELASCO Oscar, RIVAS Beatriz, ESPINOZA Jacqueline et. al. Diagnóstico de leptospirosis crónica, comparación entre la aglutinación microscópica y 3 técnicas diagnósticas confirmatorias. *Rev Cubana Med Trop* 2007;59(1)
Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol59_1_07/mtr01107.htm
38. Blood, D. C.; Hernderson, J. A.; Radostits, O. M. *Medicina veterinaria*. Editorial Interamericana, 5ta. Edición, 594 – 605, 1982.
39. Figueroa, M. *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centro América*. Editorial Universal Estatal a distancia San José, Costa Rica. 173-194, 1984.
40. Van der Hoeden J. (1958). *Epizootiology of Leptospirosis*. *Adv. Vet. Sci.* 4, 278-339.
41. Michna S.W. 1970. *Leptospirosis*. *Vet. Rec.* 86, 484-496.
42. Thiermann, A.B. 1984. *Leptospirosis: current developments and trends*. *JAVMA* 184, 722-725.
43. Timoney, J..F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. 1988. *The Spirochetes*, In: Hagan & Bruner's *Microbiology and infectious diseases of domestic animals*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, 45-57.
44. Heath S.E. and Johnson, R. 1994. *Leptospirosis*. *JAVMA* 205, 1518-1523.
45. Ellis, W.A. 1994. *Leptospirosis as a cause of reproductive failure*. *Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract.* 10:463-478
46. Chamizo, E. 1998. *Manual de Patología Veterinaria Especial*. Ed. ISCAH. 269-271.
47. Guijarro, R. y Calvo, E. 1999. *Tratamiento y control de leptospirosis bovina*. *Producción Animal*, 146:27-36.
48. Ellis, W.A. 1986. *The diagnosis of Leptospirosis in farm animals*, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) *Present state of Leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, 13-31.
49. Ellis W.A. 1996. *Leptospirosis*. *OIE Manual: Amedment I*, 1-8.
50. Arimitsu, Y., Kmety, E., Ananyina, Y., Baranton, G., Ferguson, I. R. , Smythe, L. and Terpstra, W. J. 1994. *Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of Leptospirosis*. *Bull. WHO* 72:395-399.
51. [Bartlett & Stirling \(2003\)—A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6](#)
52. Coleman, WB y Tsongalis, GJ (2006). *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4.pgs. 47-56 y 65-74.
53. Watson, J, D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene (Fifth edition edición)*. San Francisco: Benjamin Cummings.ISBN 0-321-22368-3.
54. Coleman, WB y Tsongalis, GJ (2006). *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4.pgs. 47-56 y 65-74.

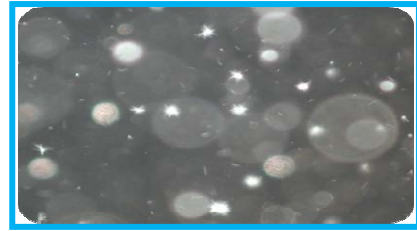
55. Scott L. Butler, Mark S.T. Hansen & Frederic D. Bushman (2007). [«A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo»](#). Nature Medicine (7): pp. 631-634. Doi: 10.1038/87979.
56. James P. Noonan, Graham Coop, Sridhar Kudaravalli, Doug Smith, Johannes Krause, Joe Alessi, Feng Chen, Darren Platt, Svante Pääbo, Jonathan K. Pritchard, Edward M. Rubin (17 de noviembre de 2006). [«Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA»](#). Nature Medicine 314 (5802): pp. 1113 - 1118. DOI: 10.1126/science.1131412.
57. Butler, JM (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR. Academic Press pgs 63-84. ISBN 0-12-147952-8.
58. Jinguo Hu1 and Carlos F. Quiros (1991). [«Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers»](#). Plant Cell Reports 10 (10). DOI: 10.1007/BF00234583.
59. Bandow J, Baker JD, Berth M, Painter C, et al.: Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies - COPD biomarker discovery study. Proteomics 2008.
60. Berth M, Moser FM, Kolbe M, et al: The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 76 (6):1223-43.
61. Holt, J.G., Hrieg N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Ed., Baltimore, USA. 9th edición. 27-37.

ANEXOS

ANEXO 1. SEROVARES DE LEPTOSPIRA SP. UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

	ESPECIES	SEROGRUPO	SEROVAR	CEPA
1	<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	Australis	Ballico
2	<i>L. noguchii</i>	<i>Australis</i>	Nicaragua	1011
3	<i>L. interrogans</i>	<i>Autumnalis</i>	Autumnalis	Akiyami A
4	<i>L. borgepetersenii</i>	<i>Ballum</i>	Castellonis	Castellon 3
5	<i>L. interrogans</i>	<i>Bataviae</i>	Bataviae	Swart
6	<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	Canicola	Hond uterecht iv
7	<i>L. Weilii</i>	<i>Celledoni</i>	Celledoni	Celledoni
8	<i>L. kirschneri</i>	<i>Cynopteri</i>	Cynopeteri	3522c
9	<i>L. interrogans</i>	<i>Djasiman</i>	Djasiman	Djasiman
10	<i>L. kirschneri</i>	<i>Grypptyphosa</i>	Grypptyphosa	Moskva v
11	<i>L. interrogans</i>	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
12	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	Icterohaemorrhagia	Rga
13	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	Copenhageni	M20
14	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	Copenhageni	Wijnberg
15	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	Icterohaemorrhagia	Kantorowic
16	<i>L. borgepetersenii</i>	<i>Javanica</i>	Javamca	Veldrat batavia
17	<i>L. noguchii</i>	<i>Louisiana</i>	Louisina	Lsu1945
18	<i>L. weilii</i>	<i>Manhao</i>	Qingshui	L 105
19	<i>L. borgepetersenii</i>	<i>Mini</i>	Mini	Sari
20	<i>L. noguchii</i>	<i>Panama</i>	Panama	Cz 214
21	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	Pomona	Pomona
22	<i>L. interrogans</i>	<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes	Salinem
23	<i>L. meyeri</i>	<i>Ranarum</i>	Ranarum	Icf
24	<i>L. weilii</i>	<i>Sarmin</i>	Sarm 111	Sarmin
25	<i>L. borgepetersenii</i>	<i>Sejroe</i>	Sejroe	M84
26	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	Hardjo	Hardjoprajitno
27	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	Wolffi	3705
28	<i>L. biflexa</i>	<i>Semarang</i>	Patoc	Patoc 1
29	<i>L. santarosai</i>	<i>Shermani</i>	Shermani	1345 k
30	<i>L. borgepetersenii</i>	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Perepelitsin

Microaglutinación de antígenos vivos (MAT)



- PCR

Materiales y equipo utilizados en el PCR



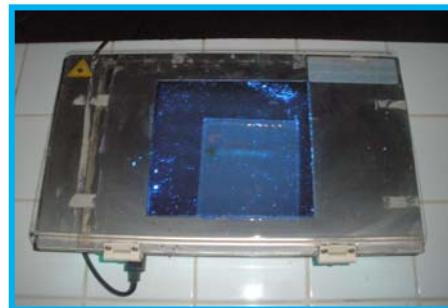
Micropipetas
Viales



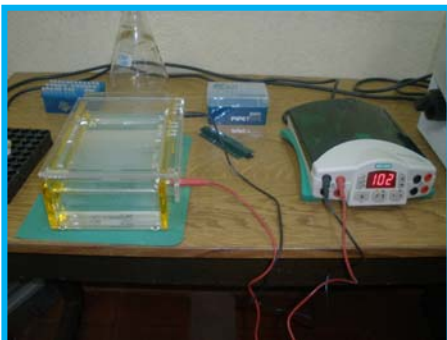
Termociclador



Baño maría

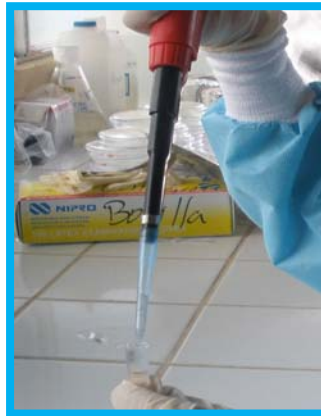


Transiluminador UV

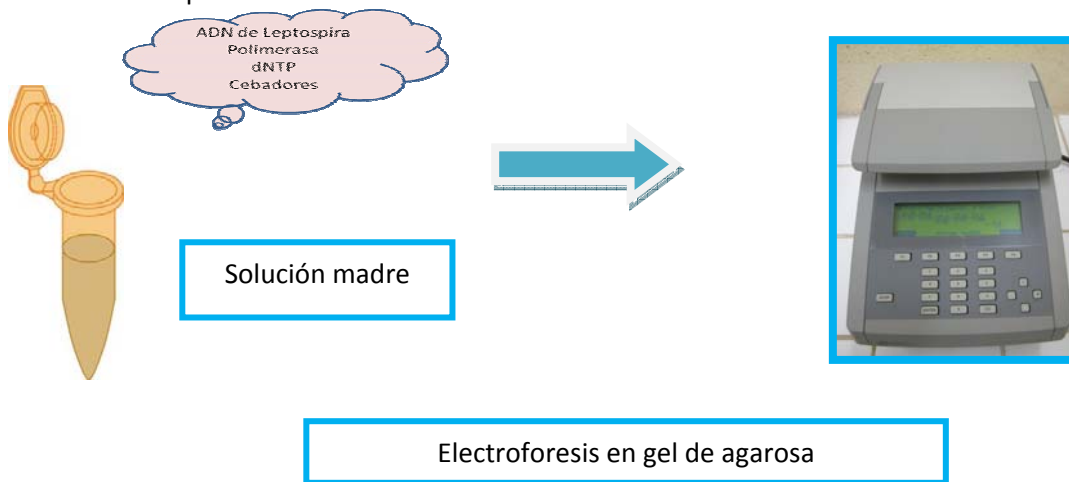


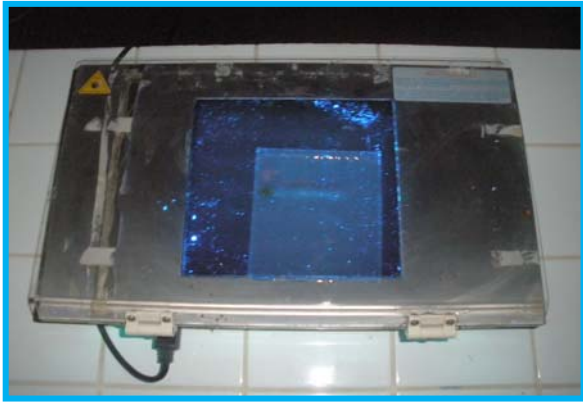
Cámara de electroforesis y la carga de poder

- Proceso de lavado y extracción de ADN:



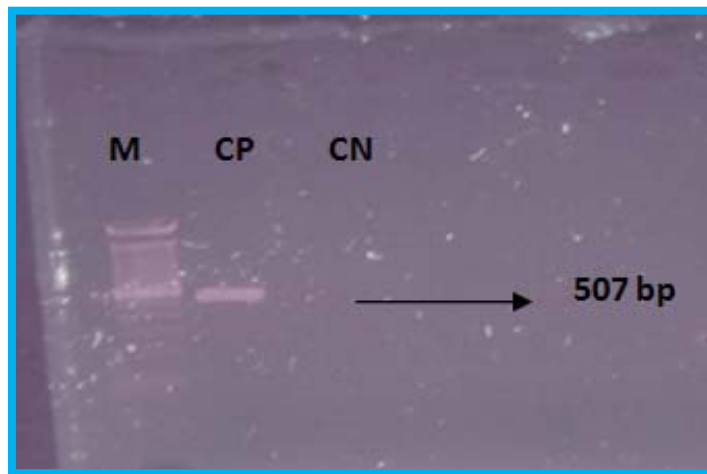
- Amplificación





Revelado en el transiluminador UV

Resultados del PCR



Productos de PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 507 bp. M; Marcador de 100 bp (Roche Biochemicals); CP: Control positivo (Cepa); Control negativo (Cepa).