

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA

**“ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE
UNA TÉCNICA DE qPCR PARA LA DETECCIÓN
DE *Leptospira* spp. PATÓGENAS EN MUESTRAS
DE ORINA DE CANINOS DOMÉSTICOS”**

TESIS

para optar el Grado Académico de MÉDICO VETERINARIO

AUTOR

SEDANO SÁNCHEZ, ANDRÉ FELIPE

Lima – Perú

2014

Ante todo a ti mi Dios que me diste la oportunidad de vivir, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres, Jorge y Miriam, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo eso les agradezco con todo mi corazón...Lo logré papás!!!

A mi abuelito Felipe que desde el cielo, me guía para salir adelante. Aunque estuvimos poco tiempo juntos, fueron los mejores de mi infancia.

A mis hermanas Blanca y Maricielo por ser parte importante en mi vida, gracias por las fuerzas y los buenos deseos. A mis tías por confiar en mí y brindarme su apoyo.

A mis amigos por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Gracias los quiero mucho!

A todas esas personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis es un esfuerzo en el cual directa e indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimos, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. A cada uno de ellos, miles de gracias.

Gracias Dra. Sonia Calle por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta tesis, por todo el apoyo y facilidades que me brindó; y por darme la oportunidad de crecer y aprender cosas nuevas.

A Chris Pinto, por toda la ayuda que me has dado, por tu paciencia ante mi inconsistencia, por tu valiosa dirección y apoyo para seguir hasta la culminación de esta tesis. Gracias por ser una gran maestra y amiga.

*A Juan Siuce, por tus consejos, paciencia, apoyo y ánimo que me brindaste, por darme ese último empujón en la conclusión de esta tesis...
Gracias Juancho, salud!!*

A Gabriela Pacheco, gordis gracias por tus palabras de ánimo, no sabes cuanto me han ayudado, eres una de las personas por la cual siento gran admiración y me siento orgulloso de ser tu amigo, te quiero mami!!.

A Guille por ser un excelente amigo y compañero en el desarrollo de esta tesis, por haberme tenido la paciencia necesaria y motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación y gracias también por las orinas de Pongo jajaja..Grande Guille!!.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS	ix
I-INTRODUCCIÓN	1
II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. El género <i>Leptospira</i>	4
2.1.1. Taxonomía y clasificación	4
2.1.1.1. Clasificación serológica	5
2.1.1.2. Clasificación genética	6
2.1.2. Características generales	7
2.1.2.1. Morfología y composición celular	7
2.1.2.2. Factores que favorecen su crecimiento	9
2.1.3. Cultivo bacteriano	10
2.2. La leptospirosis	10
2.2.1. Epidemiología	11
2.2.1.1 Factores de riesgo	11
2.2.1.1.1. Factores del patógeno	12
2.2.1.1.1. Factores del Hospedador	14
2.2.1.1.2. Factores ambientales	17
2.2.1.2. Transmisión	17
2.2.1.3. Leptospirosis y salud pública	18

2.2.1.4. Distribución	18
2.2.1.4.1. Leptospirosis en el Perú	21
2.2.2. Patogenia	23
2.2.3. Aspectos clínicos	24
Leptospirosis canina	26
2.3. Diagnóstico microbiológico	27
2.3.1. Detección directa	29
2.3.2. Aislamiento	29
2.3.3. Diagnóstico serológico	29
2.4. Diagnóstico molecular	31
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	31
III-MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Lugar de estudio	33
3.2. Muestras	33
3.3. Materiales y Equipos	34
3.4. Reactivos	34
3.5. Estandarización de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan para la detección genética de cepas patógenas de <i>Leptospira</i> spp.	35
3.5.1. Extracción de ADN	35
3.5.1.1. Extracción de ADN de cultivos de leptospirosis en caldo EMJH	35
3.5.1.2. Extracción de ADN de leptospirosis en orinas infectadas experimentalmente de caninos domésticos	37
3.5.1.3. Extracción de ADN de otros géneros bacterianos	38

3.5.2. Evaluación de ADN extraído	39
3.5.3. Cebadores utilizados en la técnica de qPCR con sondas TaqMan	39
3.5.4. PCR en tiempo real con sondas TaqMan	39
3.6. Análisis de los resultados	41
IV-RESULTADOS	42
4.1. Extracción de ADN	42
4.2. Estandarización de la PCR en tiempo real	43
4.2.1. Especificidad de la técnica PCR en tiempo real	43
4.2.2. Sensibilidad de la técnica PCR en tiempo real	45
4.2.3. Detección de <i>Leptospira</i> spp patógena en orina	46
4.2.4. Eficiencia de la amplificación	47
V-DISCUSIÓN	49
VI-CONCLUSIONES	55
VII-LITERATURA CITADA	56
VIII. APÉNDICE	70

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial en salud pública. La enfermedad en humanos está asociada a la presencia de la bacteria *Leptospira* spp. en los animales, en las zonas urbanas los animales domésticos como el perro juegan un rol importante en la transmisión de la enfermedad. Los caninos domésticos pueden desarrollar la enfermedad o ser portadores asintomáticos que eliminan la bacteria en grandes cantidades en la orina. El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar e implementar una técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan para detectar la presencia de leptospirosis patógenas en muestras de orina de caninos domésticos infectadas experimentalmente con cepas patrón de *Leptospira* spp. Las muestras de orina fueron obtenidas de un perro clínicamente sano y negativo a la prueba de microaglutinación (MAT). Se utilizaron los cebadores Lepto R y Lepto F, específicos para *Leptospira* spp., y una sonda TaqMan Lepto probe, que amplifican e hibridan respectivamente una porción del gen *rrs*, capaces de diferenciar entre especies patógenas y no patógenas de leptospira. Se estandarizó el protocolo de PCR en 35 ciclos, con un proceso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por una desnaturalización a 95°C por 15 segundos y finalmente el alineamiento y extensión en un solo paso a 60°C por 1 minuto. Los valores de Ct determinados durante la estandarización de la PCR, estuvieron en un rango de 12.53 a 18.21 para las 25 cepas patógenas de *Leptospira* spp., las cepas saprófitas y otros géneros bacterianos no dieron productos específicos. El estándar fue detectado hasta una dilución de 10^2 con un Ct de 29.98 a una eficiencia de 1.13 y con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.993. Se detectó ADN en las muestras de orina infectada desde la dilución de 10^7 leptospirosis/ml con un valor de Ct de 17.54 hasta una mínima dilución de 10^2 leptospirosis/ml con un valor de Ct de 29.87.

Palabras claves: caninos domésticos, PCR en tiempo real, sondas TaqMan, *Leptospira* spp., Leptospirosis, orina

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease of global importance in public health. The disease in humans is associated with the presence of the bacteria *Leptospira* spp. in animals; in urban areas domestic animals such as dogs play an important role in the transmission of the disease. Domestic canines infected with the bacteria can develop the disease or be asymptomatic carriers, eliminating bacteria in large quantities in their urine. This study aimed to standardize and implement a TaqMan Real-Time PCR assay to detect the presence of pathogenic leptospires in urine samples of domestic canines experimentally infected with standard strains of *Leptospira* spp. Urine samples were obtained from a clinically healthy dog, negative to the Microagglutination Test (MAT). The primers Lepto R and Lepto F specific for *Leptospira* spp. and a Lepto TaqMan probe were used, which amplified and hybridized respectively a portion of the *rrs* gene, differentiating between pathogenic and nonpathogenic species of *Leptospira*. Thermocycling program was standardized with 35 cycles of 95° C for 15 seconds and 60° C for 1 minute with an initial cycle of 95° C for 5 minutes. Ct values determined during the standardization of PCR were from 12.53 to 18.21 for the 25 pathogenic strains of *Leptospira* spp. In contrast saprophytic leptospira and other species of bacteria did not produce any specific Ct value. The standard strain was detected up to a dilution of 10² with a Ct value of 29.98 at an efficiency of 1.13 and a correlation coefficient (R²) of 0.993. DNA was detected in infected urine samples from the dilution of 10⁷ leptospires/ml with a Ct value of 17.54 to a minimum dilution of 10² leptospires/ml with a Ct value of 29.87.

Keywords: domestic canines, real time PCR, TaqMan probe, *Leptospira* spp., Leptospirosis, urine

LISTA DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

A. Lista de Cuadros

- Cuadro 1: Cepas referentes para las 20 especies descritas en el género *Leptospira*. Pág. 5.
- Cuadro 2: Ejemplos de serovares de leptospiros que se encuentran en múltiples especies Pág. 7.
- Cuadro 3: Serovares de *Leptospira* spp y especies animales de los que son comúnmente aislados. Pág. 15.
- Cuadro 4: Reservorios animales importantes de leptospiros patógenas Pág. 16.
- Cuadro 5: Incidencia Anual de leptospirosis en el mundo. Pág. 20.
- Cuadro 6: Casos e Incidencia de leptospirosis por departamento, Perú–2013. Pág. 22.
- Cuadro 7: Manifestaciones clínicas de leptospirosis en los animales domésticos Pág. 25.
- Cuadro 8: Diagnóstico de laboratorio de leptospirosis canina. Pág. 28.
- Cuadro 9: Serovares de *Leptospira* spp utilizados para la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real. Pág. 36.
- Cuadro 10: Modificaciones realizadas al protocolo base para la extracción de ADN de *Leptospira* spp. en caldo EMJH. Pág. 37.
- Cuadro 11: Otros Géneros bacterianos utilizados en la estandarización de la PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Pág 38.
- Cuadro 12: Cebadores y sonda utilizados en la estandarización de qPCR para la detección de *Leptospiras* patógenas. Pág 39.
- Cuadro 13: Concentración de reactivos para la PCR en tiempo real. Pág 40.
- Cuadro 14: Protocolos de qPCR para la detección de *Leptospiras* patógenas. Pág 40.
- Cuadro 15: Valores de Ct de los productos obtenidos de 25 cepas patógenas de referencia, una cepa saprófita y otros géneros bacterianos. Pág 44.
- Cuadro 16: Valores de Ct de los productos obtenidos en la PCR tiempo real de las diluciones decrecientes de una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Autumnalis). Pág 46.

Cuadro 17: Valores de Ct de los productos obtenidos en las diluciones decrecientes de las orinas infectadas con cepas patógenas de *Leptospira*. (Serogrupo Ballum). Pág. 46.

B. Lista de Figuras

- Figura 1: Microscopía electrónica de *Leptospira* spp. Extremos en forma de ganchos. Pág. 8.
- Figura 2: Microscopía electrónica de *Leptospira* spp. mostrando el flagelo periplásmico y la membrana externa. Pág. 9.
- Figura 3: *Leptospira* spp en campo oscuro, se observan las espiroquetas como pequeños cocos. Pág. 9.
- Figura 4: Cinética de la leptospirosis. Pág. 27.
- Figura 5: Electroforesis de extracción de ADN leptospiral. Pág 42.
- Figura 6: Gráfica de los valores de Ct en las 25 cepas patógenas de *Leptospira* spp. Pág 43.
- Figura 7: Gráfica de los valores de Ct de las diluciones de un serovar patógeno de *Leptospira* (serogrupo Autumnalis). Pág 45.
- Figura 8: Gráfica de los valores de Ct de las diluciones de las orinas infectadas con una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Ballum). Pág 47
- Figura 9: Gráfica de la curva de calibración del estándar (Serogrupo Autumnalis) Pág 48

C. Lista de Anexos

- Anexo A1: Protocolo de extracción de ADN de *Leptospira* spp de cultivos bacterianos en EMJH. Pág 74
- Anexo A2: Protocolo de extracción de ADN de *Leptospira* spp de muestras de orina infectadas experimentalmente. Pág 75
- Anexo A3: Protocolo de extracción de ADN de otros géneros bacterianos. Pág 76

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de gran impacto en la salud pública a nivel mundial. Es causada por bacterias patógenas pertenecientes al género *Leptospira*, que afecta a los seres humanos y a casi todas las especies de mamíferos tanto silvestres como domésticos, siendo los roedores los principales reservorios de leptospirosis, excretándolas en la orina durante años. Está presente en todos los continentes excepto en la Antártida, con más de 200 serovariedades (Acha y Scyfres, 2003; WHO e ILS, 2003; Navarrete *et al.*, 2006; OMS, 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

La leptospirosis es considerada una enfermedad endémica, epidémica y reemergente, debido a su incremento tanto en países en desarrollo como desarrollados. Anualmente se reportan más de 500,000 casos severos con tasas de mortalidad que oscilan entre el 10% y el 40%. (WHO, 1999; Hartskeel *et al.*, 2001; Hartskeel, 2005; OMS, 2008). En el Perú a partir del año 2011, se observa un incremento de casos, siendo mayor en los años 2012 y 2013, en los cuales se presentaron brotes en los departamentos de Loreto y San Martín (Vargas, 2014). Sin embargo, la carga de la enfermedad se subestima significativamente debido a la mala calidad de los datos de vigilancia, la dificultad de diagnóstico, y la poca sensibilidad de las pruebas diagnósticas convencionales (McBride *et al.*, 2005).

Los seres humanos generalmente adquieren la leptospirosis por contacto directo con la orina de animales infectados o indirectamente a través del suelo y el agua que ha sido contaminada por esta orina. La transmisión de humano a humano ocurre muy raramente (Levett, 2001; OMS, 2008). Aunque la leptospirosis ha sido tradicionalmente catalogada como una enfermedad ocupacional y de ambientes rurales, recientemente emerge como un problema de epidemias urbanas (Romero y Sánchez, 2009; Mendes *et al.*, 2011). A pesar de que los roedores se consideran el principal reservorio, los perros podrían tener relevancia epidemiológica en la leptospirosis urbana debido a su estrecha relación con el hombre (Blum, 2013). Sin embargo y a pesar de su marcada importancia en salud pública, la leptospirosis canina, frecuentemente es subdiagnosticada (Silva y Riedemann, 2007). En términos generales, el reconocimiento clínico de la leptospirosis canina no es factible de realizar, dado que las leptospiras pueden afectar diferentes sistemas orgánicos, resultando en una extensa variedad de presentaciones clínicas (Effler *et al.*, 2002).

El estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis es la prueba de aglutinación microscópica (MAT) la cual detecta anticuerpos específicos contra *Leptospira* spp. en muestras de suero de pacientes clínicamente sospechosos. Sin embargo la MAT a menudo no es positiva hasta después del séptimo día de la enfermedad y por tanto pueden ser inoportunas para el inicio de tratamiento (Cole y Pursell, 1973; Céspedes, 2005). La detección de ADN en muestras clínicas se está utilizando cada vez más, y ya se han desarrollado ensayos de PCR para la detección de leptospiras patógenas. En la fase aguda de la enfermedad, las leptospiras están presentes en grandes cantidades en varios fluidos corporales como la sangre, el líquido cefalorraquídeo y la orina. Por lo tanto, se puede obtener una alta sensibilidad para los ensayos de PCR cuando se toman las muestras antes de iniciar la terapia antimicrobiana (Ahmed *et al.*, 2009; Slack *et al.*, 2007; Villumsen *et al.*, 2010). Los ensayos de PCR convencionales no han sido bien evaluados, dejando su valor diagnóstico poco claro. Se ha sustituido por PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), que combina la amplificación y detección del producto amplificado en el mismo recipiente de reacción con una excelente sensibilidad y especificidad. La detección puede llevarse a cabo utilizando SYBR Green, que proporciona una detección sensible, pero es menos específico que la detección

utilizando tecnología de sondas de hibridación específicas, tales como las sondas TaqMan (Merien *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995; Espy *et al.*, 2006).

El objetivo del presente estudio es implementar y estandarizar una técnica molecular que evaluará la presencia de leptospiras patógenas en orina de caninos domésticos a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) con sondas TaqMan.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El género *Leptospira*

2.1.1. Taxonomía y clasificación

Las leptospiras son bacterias que se ubican en la División *Procariontas*, Clase *Schizomicetes*, Orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiraceae*, Género *Leptospira*. (Laguna, 2000; WHO e ILS, 2003) Antes de 1989, el Género *Leptospira* se dividió en dos especies: *Leptospira interrogans* (cepas patógenas) y *Leptospira biflexa* (cepas saprofitas). Estos dos grupos difieren en sus requerimientos nutricionales y otras propiedades fenotípicas. Por ejemplo, el crecimiento de cepas patógenas es inhibido por el análogo de la purina 8-azaguanina, mientras que las cepas saprofitas crecen normalmente en presencia de este compuesto (Johnson y Rogers, 1964). Las cepas patógenas tienen un tiempo de generación de alrededor de 20 h, y se considera que son bacterias de crecimiento lento, mientras que las cepas saprofitas crecen más rápidamente, alrededor de 5 h (Cerqueira y Picardeau, 2009; Galloway y Levett, 2010). Actualmente el género *Leptospira* incluye 20 especies (cuadro 1) y más de 300 serovares, agrupados en 24 serogrupos (Picardeau, 2013). Estas 20 especies a su vez se clasifican en tres grupos según su filogenia y patogenicidad en patógenas, intermedias y saprófitas (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Cuadro 1. Cepas referentes para las 20 especies descritas en el género *Leptospira*

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
Patógenas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	Cz 214 k
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao	3L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. Kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermedias			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-48
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	ND	ND	5399
Saprófitas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo
ND: No determinada			

Fuente: Picardeau, 2013

2.1.1.1. Clasificación serológica

La prueba de análisis de absorción de aglutinación cruzada (CAAT) dio lugar a la definición de los serovares, que se consideran hoy en día como la unidad sistemática básica para *Leptospira* spp. Dos cepas se consideran diferentes si, después de la absorción cruzada con cantidades adecuadas de antígenos heterólogos, por lo menos 10% del título heterólogo permanece regularmente asociado con uno de los dos

antisueros (Cerqueira y Picardeau, 2009). Así las especies fueron divididas en serovares y los serovares se agrupan en serogrupos. La estructura de los lipopolisacáridos (LPS) es el principal determinante del serovar. (Galloway y Levett, 2010; Picardeau, 2013). Más de 24 serogrupos y 250 serovares de leptospiras patógenas se han descrito hasta la fecha (Galloway y Levett, 2010). El concepto serovar ha sido ampliamente aceptado, ya que tiene un cierto valor epidemiológico, pero no tiene ninguna posición taxonómica (Levett y Haake, 2009).

2.1.1.2. Clasificación genética

Yasuda *et al.* (1987) demostraron por hibridación genómica de ADN-ADN que las diversas cepas de *L. interrogans sensu lato* constituyen no uno, sino al menos seis diferentes especies. En base a otros experimentos de hibridación de ADN, un total de 20 especies ahora se han descrito en el género *Leptospira* (Yasuda *et al.*, 1987; Perolat *et al.*, 1998; Brenner *et al.*, 1999; Levett *et al.*, 2005, 2006; Matthias *et al.*, 2008; International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008; Slack *et al.*, 2008, 2009). De estas 20 especies genómicas, seis especies son saprofitas (cepas no patógenas medioambientales), nueve especies son patógenas (cepas aisladas de seres humanos o animales) y cinco especies son llamadas "intermedias", estas son distintas de los agentes patógenos y saprofitos, de acuerdo con su secuencia de ARNr 16S, y para las cuales la virulencia no se ha demostrado experimentalmente (Picardeau, 2013).

Varios estudios han demostrado una falta de relación entre la serotipificación y la clasificación molecular (Cuadro 2), lo que sugiere que los genes que determinan el serotipo pueden ser transferidos horizontalmente entre especies. La base de la transferencia horizontal entre las diferentes especies de *Leptospira* spp, que se presumen responsables del intercambio genético de los determinantes de LPS, se desconoce (Cerqueira y Picardeau, 2009). La clasificación molecular todavía no se utiliza en los laboratorios clínicos y microbiológicos hasta que los métodos de identificación basados en el ADN estén ampliamente disponibles, por ahora la clasificación serológica es la que se mantiene (Markey *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Ejemplos de serovares de leptospiras que se encuentran en múltiples especies

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

Fuente: Levett, 2001.

2.1.2. Características generales

2.1.2.1. Morfología y composición celular

Las leptospiras son espiroquetas Gram negativas que presentan características morfológicas únicas en el mundo bacteriano. Son finas, flexibles con espiras muy cerradas, miden alrededor de 0,1 μm de diámetro por 6-20 μm de longitud; tienen extremos en forma de gancho distintivos (Figura 1) (Faine *et al.*, 1999; Picardeau *et al.*, 2001; Torales, 2002; Brooks *et al.*, 2010).

Muestran movilidad activa incluso en los medios más viscosos, que se advierte mejor en la microscopia de campo oscuro. Esta gran movilidad se debe a la presencia de un órgano locomotor interno llamado endoflagelo, las leptospiras presentan dos endoflagelos o flagelos periplásmicos con inserciones polares que se encuentran en el espacio periplásmico, las proteínas FlaA y FlaB constituyen la vaina flagelar y el núcleo, respectivamente. Se han descrito tres tipos de movimientos de las leptospiras: rotación alrededor de su eje central, movimientos progresivos rectos y movimientos circulares (Picardeau *et al.*, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2010; Picardeau, 2013).

Las leptospiras tienen una típica estructura de membrana doble en el que la membrana citoplasmática y la pared celular de peptidoglicano están estrechamente asociados y se superponen por una membrana exterior (Cullen *et al.*, 2004). Dentro de

la membrana externa, el LPS constituye el principal antígeno de la leptospira. Es estructuralmente e inmunológicamente similar al LPS de los organismos Gram negativos, sin embargo, es relativamente no tóxico para las células o los animales, siendo tanto como 12 veces menos letal para los ratones en comparación con el LPS de *E. coli* (Faine *et al.*, 1999). Las leptospiras poseen oxidasa, catalasa y peroxidasa; pero no pueden distinguirse entre especies por sus características bioquímicas (Erosa-Barbachano, 2001).

En las micrografías electrónicas se identifica un fino filamento axial y una membrana delicada (Figura 2). La espiroqueta es tan delicada que en la imagen de campo oscuro aparecerá solo como una cadena de pequeñísimos cocos (figura 3). No capta fácilmente los colorantes aunque puede ser impregnada con plata (Brooks *et al.*, 2010).

Las leptospiras poseen dos cromosomas circulares uno de mayor tamaño que asciende a 4.332.241 bp (4 Mpb) y uno pequeño de 358.943 bp (300 kpb), los que juntos suman 4.691.184 bp con un contenido de guanina/citosina (G/C) de 35-41%. Un replicón adicional de 74 kpb se ha localizado en *L. biflexa*, la cual puede tener un cuarto replicón de 74 kpb (Ren *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2009).

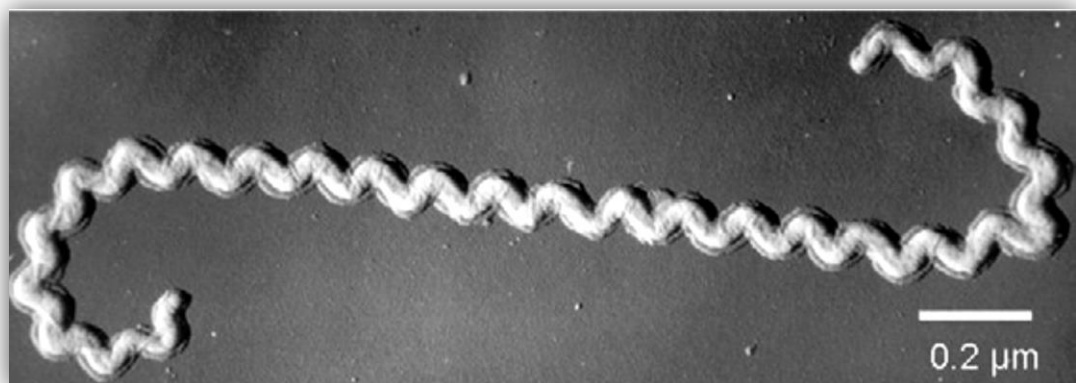


Figura 1. Microscopía electrónica de *Leptospira* spp. Extremos en forma de ganchos (Picardeau, 2013)



Figura 2. Microscopía electrónica de *Leptospira* spp. mostrando flagelo periplásmico y membrana externa. (Gyles, 2010)

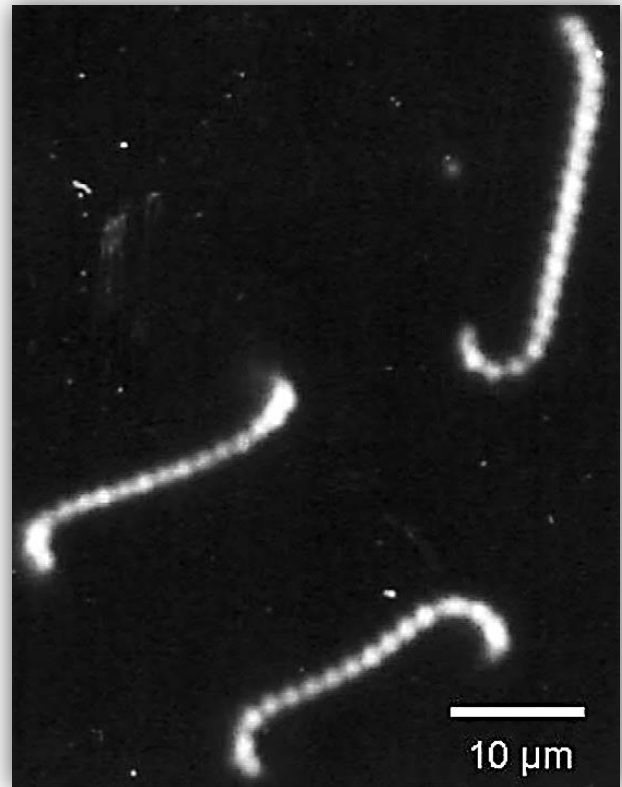


Figura 3. *Leptospira* spp en campo oscuro, se observan las espiroquetas como pequeños cocos (Picardeau, 2013).

2.1.2.2. Factores necesarios para su crecimiento

Las leptospiras son aerobios obligados con una temperatura óptima de crecimiento de 28 - 30 °C. Crecen en medios simples enriquecidos con vitaminas B1 y B12, ácidos grasos de cadena larga, y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga se utilizan como única fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación. Las sales de amonio constituyen la fuente principal de nitrógeno. Los microorganismos sobreviven semanas en el agua, en particular si tienen pH alcalino (Faine *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2010).

2.1.2.3. Cultivo bacteriano

Se ha descrito el crecimiento de las leptospiras en medios que contienen suero o albúmina y en medios libres de proteínas sintéticas. Varios medios líquidos enriquecidos con suero de conejo fueron descritos en el pasado por Fletcher, Korthoff, Noguchi, y Stuart (Faine *et al.*, 1999). Actualmente, el medio más ampliamente utilizado es el medio líquido Ellinghausen-McCullogh–Johnson-Harris (EMJH) que contiene ácido oleico, albúmina de suero bovino y polisorbato (Tween). Algunas cepas requieren la adición de piruvato o suero de conejo para el aislamiento inicial (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

El crecimiento de los contaminantes de las muestras clínicas puede ser inhibido por la adición de 5-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina (Faine *et al.*, 1999). El crecimiento de las leptospiras es a menudo lento en el aislamiento primario y los cultivos tienen que ser observados durante 13 semanas antes de ser desechados. Se puede añadir agar en concentraciones bajas (0,1-0,2%). En tales medios semisólidos, el crecimiento alcanza una densidad máxima en una zona discreta debajo de la superficie del medio, que se vuelve cada vez más turbia mientras progresa la incubación. Este crecimiento está relacionado con la tensión óptima de oxígeno y se conoce como anillo o disco de Dinger. Los cultivos de leptospiras se mantienen mediante subcultivos repetidos o por almacenamiento en agar semisólido que contiene hemoglobina. El almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido también produce buenos resultados y es el método preferido de almacenamiento para mantener la virulencia (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

2.2. La leptospirosis

La leptospirosis, conocida también como enfermedad de Weil, es una de las zoonosis bacterianas más difundidas en el mundo. Además, debido a las afecciones que produce en el hombre y los animales, así como por su repercusión económica en los países pobres y ricos, constituye una enfermedad de extraordinaria importancia para la medicina humana y la medicina veterinaria (Levett 2001; McBride *et al.*, 2005; WHO, 1999).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera a la leptospirosis como una de las zoonosis desatendidas de las poblaciones relegadas (OMS, 2008), grupos donde hasta un 20% del total de los casos notificados evolucionan a estadios clínicos graves (WHO e ILS, 2003). Sin embargo, la carga de la enfermedad se subestima por ser significativamente pobre la calidad de los datos en la vigilancia, así como por las dificultades del diagnóstico (McBride *et al.*, 2005).

La leptospirosis es una enfermedad sistémica de los humanos y animales domésticos, principalmente perros, ganado vacuno y porcino, que se transmite por contaminación directa o indirecta con orina contaminada; se caracteriza por fiebre, insuficiencia renal y hepática, manifestaciones pulmonares e insuficiencia reproductiva. Los signos clínicos son muy variables; en la mayoría de los casos son probablemente inaparentes y se asocia a hospedadores adaptados a ciertos serovares como Canicola, en los perros, Bratislava en caballos y cerdos, Hardjo en el ganado, y Australis y Pomona en cerdos. Sin embargo, otros serovares pueden estar implicados en cuadros graves de la enfermedad (Ellis *et al.*, 1986; Bernard, 1993; André-Fontaine 2006; Grooms, 2006).

El espectro de la enfermedad humana y canina son muy similares ya que puede oscilar desde una infección subclínica a los signos severos de disfunción multiorgánica (Sykes *et al.*, 2011). Los perros pueden actuar como reservorios y ser una fuente importante de los brotes humanos. Por ello, teniendo en cuenta el bienestar animal y la conservación de la salud pública, es muy necesario un diagnóstico temprano de la leptospirosis canina (Levett 2001).

2.2.1. Epidemiología

2.2.1.1. Factores de riesgo

La aparición de leptospirosis depende de muchos factores como: Presencia de agua contaminada por desechos procedentes de animales tanto domésticos como silvestres que presentan leptospirosis prolongada (verdaderos reservorios de la infección) Así como condiciones ambientales (clima templado, tropical y subtropical;

tipo de suelo, el pH, neutro o alcalino), condiciones laborales, condiciones de recreación (Hartskeer, 2005; García *et al.*, 2013).

2.2.1.1.1. Factores del patógeno

Los estudios comparativos de biología molecular, entre cepas patógenas y saprófitas, han develado un alto número de factores de virulencia implicados activamente en la patogenia generada por la leptospira (Hung *et al.*, 2006; Hoke *et al.*, 2008). El primer factor de virulencia genéticamente definido en las leptospiras fue la lipoproteína de superficie Loa22 con dominio OmpA (Ristow *et al.*, 2007) cuya función aún se desconoce. Entre los factores de virulencia destacan enzimas con actividad como hemolisinas, fosfolipasas, catalasas, hialuronidasas y colagenasas (Xue *et al.*, 2009). Algunas de estas enzimas permiten a la leptospira realizar la invasión del hospedador haciendo uso de un proceso de translocación en la que son degradadas las membranas celulares, como la esfingomielinasa tipo C (serovares Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi), fosfolipasa D y hemolisinas (tl y ABC). Otras enzimas del grupo de las proteasas como colagenasas, metaloproteasas y varias termolisinas degradan la matriz extracelular de los tejidos (Barocchi *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004).

En la colonización, la bacteria produce dos familias de adhesinas no fimbriales. La primera tiene tres genes: ligA, ligB y ligC, que codifican para proteínas BIG (bacterial immunoglobulin-like), involucradas en la interacción hospedador-patógeno. La segunda familia consiste en tres integrinas (alfa proteínas), cada una con siete secuencias repetidas las que al parecer participan en las interacciones con el ligando (Barocchi *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004). Hay una posible participación de proteínas de membrana integral de leptospiras (OmpL 1, lipoproteínas, LipL4 y LipL32) y proteínas de membrana periférica (P31 y LipL45), algunas de ellas expresadas durante la infección del hospedador (Matsunaga *et al.*, 2003).

El peptidoglicano de las leptospiras patógenas se encuentra entre las moléculas que pueden activar al endotelio vascular e incrementar la adherencia de neutrófilos, lo que favorece la inflamación tanto local como sistémica (González *et al.*, 2013).

Se piensa que entre los componentes de la membrana externa del patógeno, el LPS es la biomolécula capaz de inducir una respuesta inmune protectora de las vacunas de células enteras de leptospiras aplicadas en los animales domésticos y en los humanos (Nally *et al.*, 2005). Hasta hace algunos años todos los antígenos protectores que se habían logrado identificar eran de naturaleza glicolipídica. Aunque los identificaron de diferentes formas (F4, TM, PE, LLS, LPS), está claro que todos se derivan del LPS de la leptospira y presentan características distintivas en cuanto a su actividad biológica y endotóxica. La protección conferida por estos lipopolisacáridos es serovar específica y muchos de los genes relacionados con su biosíntesis ya han sido dilucidados (Yang *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2009; Cinco, 2010).

En las leptospiras se han encontrado genes involucrados en la biosíntesis de polisacárido capsular; sin embargo, no existen evidencias experimentales en la producción de cápsula, pero se supone que una sustancia parecida a un biofilm le permite colonizar densamente a los túbulos renales (Levett, 2001; Nally *et al.*, 2005). Recientemente también se identificó el gen hem O, que codifica una hemo-oxigenasa (Murray *et al.*, 2008) involucrada en la virulencia en hámsteres, aunque no es esencial para el microorganismo (Murray *et al.*, 2009). Un hallazgo similar parece aplicar para las proteínas Lig expuestas en la superficie; ellas sólo están presentes en las especies patógenas y su expresión se pierde en los subcultivos, con la consiguiente pérdida de la virulencia (Xue *et al.*, 2009). Tanto LigA como LigB enlazan la fibronectina, y su expresión es regulada bajo condiciones de osmolaridad fisiológica (Choy *et al.*, 2007). Sin embargo, la inactivación de LigB no afecta la virulencia en hámsteres (Croda *et al.*, 2008). Resultados como estos conducen a los investigadores a plantear que existe un alto grado de redundancia de proteínas en las leptospiras involucradas en la adherencia, supervivencia *in vivo* y la colonización renal, sugiriendo que será difícil identificar y definir los factores de virulencia responsables de la patogenicidad (Bulach *et al.*, 2006; Hoke *et al.*, 2008; Picardeau *et al.*, 2008).

2.2.1.1.2. Factores del hospedador

Muchos serovares de leptospira parecen tener una cierta especie animal como hospedador natural, pero los animales y los seres humanos pueden ser infectados con una amplia variedad de serovares. Los serovares que causan enfermedad en los animales varían entre los países y a veces entre regiones de un mismo país. Por lo general, la mayoría de las infecciones en los animales domésticos, en una región en particular, son causadas por unos pocos serovares (Markey, *et al.*, 2013). El cuadro 3 lista algunos de los serovares que han sido comúnmente aislados de animales domésticos y salvajes.

Característicamente, un reservorio u hospedador de mantenimiento es aquel que muestra signos clínicos mínimos o nulos, pero eliminan de manera prolongada la bacteria en la orina, por ello son una importante fuente de contaminación del medio ambiente, y entre ellos los principales diseminadores son los roedores, que pueden eliminar leptospiras durante toda su vida (Najera *et al.* 2005; Markey, *et al.*, 2013). El cuadro 4 muestra algunos de los reservorios animales de leptospiras patógenas.

Los hospederos accidentales son aquellos que son menos susceptibles a la infección que los hospedadores de mantenimiento, pero presentan una enfermedad más grave y son transmisores ineficientes de la infección a otros animales. Sin embargo, la eliminación prolongada de leptospiras en la orina se puede producir en los animales que se han recuperado de la enfermedad clínica (Acha y Szyfres, 2003 Markey, *et al.*, 2013).

El conocimiento de los serovares prevalentes y sus hospedadores de mantenimiento es esencial para el entendimiento de la epidemiología de la leptospirosis y en la implementación de las medidas de control de la enfermedad en una región (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2004).

Cuadro 3: Serovares de *Leptospira* spp y especies animales de los que son comúnmente aislados (Markey, et al., 2013)

Serogrupo	serovar	Especies animales						
		Ganado	Cerdos	Perros	Caballos	Oveja	Roedores	Otros animales salvajes
Australis	Australis	+						+
	Bratislava	+	+		+			
Autumnalis	Autumnalis						+	+
Ballum	Ballum						+	+
Bataviae	Bataviae						+	
Canicola	Canicola	+	+	+			+	+
Grippotyphosa	Grippotyphosa	+	+	+	+		+	+
Hebdomadis	Hebdomadis							+
	Szwajizak	+						
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	+	+	+	+		+	+
	Copenhageni	+		+			+	
Pomona	Pomona	+	+	+	+	+		+
	Balcanica	+						
Sejroe	Hardjo	+			+	+		
	Sejroe	+					+	+
Tarassovi	Tarassovi		+					

Cuadro 4: Reservorios animales importantes de leptospiras patógenas

Serogrupo seleccionado	Reservorios primarios conocidos	Hospedadores Incidentales			Otros animales domésticos	Animales silvestres representativos
		Perro	Gato	Humano		
Bratislava	Rata, porcino, equino	+	-	+	Bovino, equino	Ratón mapache, zarigüeya, erizo, ratón de campo, zorro, zorrillo, marsupiales, comadreja, nutria.
Autumnalis	ratón	+	-	+	Bovino	Ratón, mapache, zarigüeya, marsupiales.
Icterohaemorrhagiae	Rata	+	+	+	Bovino, equino, porcino, cobayo	Ratón mapache, zarigüeya, erizo, zorro, marmota, nutria, mono, zorrillo, mangosta.
Pomona	Bovino, porcino, zorrillo, zarigüeya	+	+	+	Equino, ovino, caprino, conejo, cobayo	Ratón, mapache, erizo, lobo, zorro, marmota, leones marinos, ciervos.
Canicola	perro	+	+	+	Bovino, equino, porcino	Rata, mapache, erizo, armadillo, mangosta, marsupial, nutria, chacal, zorrillo.
Bataviae	Perro, rata, ratón	+	+	+	Bovino	Erizo, armadillo, marsupial, musaraña, gato leopardo.
Hardjo	Bovino	+	-	+	Porcino, equino, ovino	bóvidos salvajes
Australis	Rata, ratón	+	-	+	perro	marsupiales
Zanoni	Rata, ratón	+	-	+	Bovino, perro	marsupiales
Grippotyphosa	mapache, zorrillo, zarigüeya	+	+	+	bovino, cerdo, ovino, caprino, conejo, jerbo, cobayo	Ratón, rata, zorro, marsupial, ardilla, gato montés, musaraña, erizo, la rata almizclera, comadreja, topo, gato leopardo.

Fuente: Greene *et al.*, 2012

2.2.1.1.3. Factores ambientales

El clima es un factor relevante en los modelos epidemiológicos de leptospirosis; las condiciones ambientales húmedas y un clima templado favorecen la supervivencia de las leptospiras. Otro factor comprende el transporte de roedores infectados a los medios urbanos, esto es potencialmente importante cuando la infraestructura urbana es dañada por guerras o desastres naturales (Faine *et al.*, 1999; Zúñiga, 2011; Markey, *et al.*, 2013).

Las leptospiras son sensibles a la desecación, al calor, al frío excesivo y a las variaciones de pH; no toleran el medio ácido debido a que pierden su motilidad aproximadamente en 15 minutos. El pH óptimo para su multiplicación es de 7.2 a 7.4. No sobreviven en agua salada, pero pueden permanecer hasta 180 días en agua dulce, tres semanas en aguas estancadas y hasta cerca de un año en soluciones viscosas, como lodos con bajo contenido de materia orgánica (Trueba *et al.*, 2004). En suelo húmedo sobreviven por largo tiempo, mientras que en suelo seco la supervivencia es corta. Mueren a los 10 segundos cuando son calentadas a 100 °C y a los 10 minutos a una temperatura de 56 °C. En el frío puede sobrevivir hasta 100 días a -20 °C (González *et al.*, 2013).

En la leche no sobreviven, salvo si está diluida en agua a razón de 1:20 o más. La orina ácida es letal para las leptospiras, por eso, es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un enfermo. Conservan su viabilidad varios días en vísceras y carnes refrigeradas y son sensibles a los antisépticos (Erosa-Barbachano, 2001; Abuauada *et al.*, 2005; Navarrete *et al.*, 2006).

2.2.1.2. Transmisión

La infección en humanos y otros animales susceptibles se presenta por contacto directo de las mucosas con orina de los animales infectados o indirectamente a través de agua o suelos contaminados (Rodríguez *et al.*, 2004; Abgueguen *et al.*, 2008; Jiménez-Coello *et al.*, 2008). Los riesgos potenciales de infección por bañarse o nadar en estanques, lagunas o arroyos donde pastorean ganados se han demostrado

reiteradamente al igual que los aerosoles de orina en los establos y en la leche de vacas infectadas (Vijayachari *et al.*, 2008; Markey, *et al.*, 2013).

2.2.1.3. Leptospirosis y Salud pública

La prevalencia de los diferentes serovares de leptospira en la población humana depende de los reservorios animales presentes y de los serovares que éstos portan, así como de las condiciones ambientales locales, la ocupación, el grado de contacto entre los hospedadores de mantenimiento y accidentales, y las prácticas sanitarias de la población en riesgo (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2004; Rodríguez *et al.*, 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Los caninos se comportan como importantes reservorios de *Leptospira* spp y fuentes de infección para el hombre por su estrecho contacto en ambientes de riesgo no ocupacional (Silva y Riedemann, 2007; Jiménez-Coello *et al.*, 2008).

En el 2010, Romero *et al.* estudiaron la prevalencia de anticuerpos contra cepas de leptospira en una población urbana humana y canina en el distrito de Tolima-Colombia donde encontraron que la población humana mostró similares perfiles de positividad para leptospira a los encontrados en caninos. Es conveniente desarrollar futuros estudios para establecer si los perros podrían actuar como intermediarios entre los reservorios naturales (marsupiales silvestres) y el hombre (Céspedes, 2007), así como la necesidad de identificar los reservorios naturales que pueden estar participando en el ciclo de transmisión en la zona evaluada (Romero *et al.*, 2010).

2.2.1.4. Distribución

La leptospirosis tiene distribución mundial, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales dónde las condiciones medioambientales favorecen su supervivencia y transmisión (Faine, 1999; Morgan *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2008). En la actualidad la enfermedad no sólo se circunscribe en los trópicos sino que también está ocurriendo en ciudades como Hawái, Dubái, entre otras. Está asociada con actividades ocupacionales y recreacionales de las personas (Sasaki *et al.*, 1993, Sambiaba *et al.*, 2003). Con el fenómeno de globalización, los cambios climáticos y migracionales de

animales y personas, han hecho que la bacteria se disemine y que emerja en muchas regiones, convirtiéndola en un problema latente para cualquier tipo de población (Morgan *et al.*, 2002, Bharti *et al.*, 2003).

En muchos países se carece de datos epidemiológicos fiables, de manera que se hace muy difícil evaluar con precisión la carga global de esta enfermedad; pero se conoce que las áreas de mayor riesgo son: la India, Sri-Lanka, Tailandia, Vietnam, Malasia, China, Seychelles, el Caribe, Brasil, y las Islas del Pacífico. Australia, Nueva Zelanda, y Hawái por su parte tienen algunas de las incidencias más altas notificadas en los países desarrollados (Ellis *et al.*, 2008; Colleen, 2010).

Es un mito perjudicial muy difundido que la leptospirosis está limitada a los países en vías de desarrollo. Artículos retrospectivos sobre su epidemiología se describen en Irlanda, Dinamarca, Alemania e Italia (Pappas *et al.*, 2008; Vijayachari *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2009; Monahan *et al.*, 2009). En el cuadro 5 se enumera la incidencia anual de la leptospirosis humana para ciertos países, incluidos los 28 países con mayor incidencia, y otros países importantes. Como se muestra claramente la endemicidad de la enfermedad se encuentra principalmente en el Caribe y América Central y del Sur, así como en el sudeste de Asia y Oceanía (Pappas *et al.*, 2008).

Cuadro 5. Incidencia anual de leptospirosis en el mundo

Países con mayor incidencia			Países para los cuales no se dispone de datos	Otros países	
Posición	País	Incidencia anual (mil. de hab.)		País	Incidencia anual (mil. de hab.)
1	Seychelles	432,1	India	Bielorrusia	3,4
2	Trinidad y Tobago	120,4	Malasia	Bulgaria	3,7
3	Barbados	100,3	Bangladesh	Chile	1,6
4	Jamaica	78	Vietnam	Colombia	1,6
5	Costa Rica	67,2	Laos	República	1,8
6	Sri Lanka	54	Nepal	Checa	3,9
7	Tailandia	48,9	Camboya	Francia	0,7
8	El Salvador	35,8	Indonesia	Alemania	3
9	Nueva Zelanda	26	Myanmar	Grecia	3,1
10	Uruguay	25	China	Honduras	3,1
11	Cuba	24,7	Irán	Hungría	2,2
12	Nicaragua	23,3	Surinam	Irlanda	0,7
13	Croacia	17,3	Haití	Italia	2,2
14	Rusia	17,2	Perú	Lituania	1
15	Ucrania	15,3		México	1,9
16	República	13,8		Países Bajos	1,3
17	Dominicana	12,8		Panamá	1,9
18	Brasil	11,6		Paraguay	1,5
19	Ecuador	9,5		Serbia	2
20	Argentina	9,4		Singapur	2,8
21	Rumania	8,9		Corea del Sur	0,3
22	Australia	6,8		España	0,6
23	Portugal	6		Reino Unido	0,1
24	Dinamarca	5,6		E.E.U.U.	3,8
25	Letonia	5,4		Venezuela	
26	Eslovenia	4,8			
27	Filipinas	4,4			
28	Eslovaquia	4,1			
	Taiwán				

Fuente: Pappas *et al.*, 2008

2.2.1.4.1. Leptospirosis en el Perú

La leptospirosis es una enfermedad endémica en el Perú, numerosos estudios de seroprevalencia reportan la presencia de infección por leptospiras en grupos ocupacionales o poblaciones, así como en reservorios domésticos y silvestres (roedores, marsupiales y quirópteros), en diferentes partes del país por lo que el conocimiento de su situación actual es de interés en salud humana y veterinaria (Liceras de Hidalgo e Hidalgo, 1970; Céspedes *et al.*, 2004; Céspedes, 2005).

Desde que el primer caso de leptospirosis fue diagnosticado por Arce y Ribeyro en un hospital de la ciudad de Lima en 1917 (Arce y Ribeyro, 1917), se han realizado varias investigaciones para demostrar la presencia de leptospiras en humanos y en animales domésticos y silvestres. En el Perú, esta zoonosis fue considerada dentro de la vigilancia del síndrome ícterohemorrágico que el Ministerio de Salud (MINSU) inició en Cusco, Huánuco y Ayacucho, el año 1999 (Pachas *et al.*, 2001). Desde el año 2003, se inició su notificación a nivel regional, luego de la presentación de los brotes en Mayapo, distrito de Echarate, provincia La Convención, departamento de Cusco y en Los Delfines, del distrito San Juan Bautista, provincia de Maynas, departamento de Loreto (Vargas, 2014).

La leptospirosis evidencia un comportamiento endémico con brotes esporádicos que se presentan como conglomerados relacionados en tiempo y espacio, usualmente con una exposición común con agua contaminada. Hasta el 2008, se presentaron brotes en los departamentos de Ica (Cañete), Lima, Amazonas Madre de Dios, entre otros (Vargas, 2014). Entre los años 2009 y 2010, se observó una disminución progresiva de casos; sin embargo, a partir del 2011, se observa un incremento de casos, siendo mayor los años 2012 y 2013, años en los que se presentaron brotes en los departamentos de Loreto y San Martín (Vargas, 2014).

Se encontraron anticuerpos en personas en todos los departamentos del Perú, pero sólo se aislaron cepas de leptospiras a partir de muestras de humanos en Piura, Lima y Loreto. En Lima se identificaron a varios serovares como Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Monymusk, Pomona, Kremastos y Andamana que es de la especie *Leptospira biflexa*. En Loreto se identificó a un serovar nuevo llamado Aguaitia

del serogrupo Tarassovi y en Piura se mencionó como *Leptospira icteroides*. (Arce y Ribeyro, 1917; Madrid, 1974). Con respecto a la cantidad de casos por cada serogrupo, destaca en regiones de la selva el serovar nuevo llamado Varillal; el cual fue aislado en el año 2003 de una persona y de roedores en una localidad cercana a Iquitos llamada Varillal (Céspedes et al., 2006). Durante el año 2013 (Cuadro 6), se notificaron 3940 casos de leptospirosis, de los cuales se confirmaron 1881 (47,6%), cuatro casos quedaron como probables y 2059 casos fueron descartados (52,3%) (Vargas, 2014).

Cuadro 6. Casos e Incidencia de leptospirosis por departamento, Perú - 2013

Departamento	casos	%	IA X 100 000
Loreto	1282	68,2	124,6
San Martín	344	18,3	41,5
Tumbes	53	2,8	22,6
Madre de Dios	15	0,8	11,2
Ayacucho	50	2,7	7,3
Ucayali	10	0,5	2,0
La Libertad	32	1,7	1,7
Amazonas	5	0,3	1,2
Cusco	13	0,7	1,0
Huánuco	7	0,4	0,8
Lambayeque	10	0,5	0,8
Junín	9	0,5	0,7
Pasco	2	0,1	0,7
Ancash	6	0,3	0,5
Cajamarca	7	0,4	0,5
Piura	7	0,4	0,5
Lima	28	1,5	0,4
Callao	1	0,1	0,3
TOTAL	1881	100.0	6,1
IA: incidencia acumulada			

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública

En lo que va del 2014, considerando hasta la semana epidemiológica (SE) 19 (segunda semana del mes de mayo), se notificaron 1663 casos, que si bien el 30% de ellos están en proceso de confirmación, son 700 casos más que el mismo periodo del año 2013. La mayor proporción (82,2%) de los casos notificados hasta la SE 19, se concentran en el departamento de Loreto (1367/1663), mientras que el 14% de los casos se distribuyen en cinco departamentos: San Martín (78), Ayacucho (48), Madre de Dios (47), Ucayali (30) y Tumbes (25) (Vargas, 2014).

2.2.2. Patogenia

Las leptospirosas penetran en el hospedador a través de la piel erosionada, las mucosas sanas y la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua contaminada o por contacto con orina de animales enfermos o portadores (Asuthkar *et al.*, 2007; Ayanegui *et al.*, 2007; Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). Transcurridas las primeras 48 horas hay una diseminación hematológica y proliferación en órganos parenquimatosos, particularmente el hígado, los riñones, el bazo y algunas veces las meninges. Esta fase de la infección es probable que sea mediada por la secreción de enzimas capaces de degradar las membranas celulares del hospedador (Ren *et al.* 2003; Marotto *et al.*, 2010).

La leptospirosis puede considerarse una enfermedad sistémica, entidad que se traduce principalmente como una vasculitis infecciosa donde predomina la lesión vascular de tipo capilar, daño responsable del edema y la diátesis hemorrágica, que afecta fundamentalmente a los capilares del hígado, del pulmón y el riñón (Rocha *et al.*, 2010). El gran daño tisular, en presencia de pocos microorganismos, sugiere la mediación de factores tóxicos de la espiroqueta y del hospedador (Asuthkar *et al.*, 2007; Ayanegui *et al.*, 2007; Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). Sin embargo hasta la actualidad no existe evidencia de una toxina clásica secretada por las leptospirosas (Silva *et al.*, 2008).

La producción de anticuerpos en animales infectados comienza unos pocos días después de la aparición de la leptospiremia y las leptospirosas se eliminan de la circulación unos 10 días después de la infección, son fagocitadas por los macrófagos en

la presencia de anticuerpos específicos, pero las leptospiras virulentas pueden inducir la apoptosis de los macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (Merien *et al.* 1997, 1998, Choy *et al.*, 2007; Chierakul *et al.*, 2008). La respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la leptospirosis a través de la formación de inmunocomplejos, la liberación de citoquinas y la generación de una vasculitis autoinmune (Cinco *et al.*, 2006). En consonancia, los resultados de investigaciones clínicas realizadas en Brasil sugieren que la gravedad de la leptospirosis podría relacionarse con la intensidad de la respuesta inmune (Malajov *et al.*, 2007).

Las leptospiras tienden a persistir en sitios como los túbulos renales, los ojos y el útero, donde la actividad de anticuerpos es mínima. En los riñones, los organismos se localizan en el lumen de los túbulos contorneados proximales. La relativa facilidad con la que el establecimiento y la persistencia de la infección ocurren en hospederos de mantenimiento puede explicarse en parte por la regulación negativa de algunas lipoproteínas de membrana externa *in vivo* y la consiguiente falta de reconocimiento de la infección por la respuesta inmune del hospedador (Haake *et al.* 1998).

2.2.3. Aspectos clínicos

La gravedad de la leptospirosis puede oscilar desde una enfermedad subclínica hasta los casos fatales; las manifestaciones son tan variables que no son patognomónicas, y puede clínicamente parecerse a muchas enfermedades y ser diagnosticada erróneamente como dengue, arbovirosis, meningitis, hepatitis, influenza, entre otros (Céspedes *et al.*, 2006).

El cuadro 7 resume las manifestaciones clínicas de leptospirosis en los animales domésticos. La evidencia serológica indica que una variedad de serotipos de *Leptospira* spp puede infectar a los gatos, pero la enfermedad parece ser poco común en este animal (Markey, *et al.*, 2013). En gatos la prevalencia de leptospirosis clínica es muy baja, siendo probable que estos animales estén expuestos a las leptospiras excretadas por animales salvajes o perros con los que conviven. En general, los estudios de serovigilancia muestran una tasa de exposición de un 10% o menos. Los gatos que

viven fuera de la casa tienen la seroprevalencia más alta, aislándose en esta especie los serovares Canicola, Grippotyphosa y Pomona (Greene *et al.*, 2012).

Cuadro 7. Manifestaciones clínicas de leptospirosis en los animales domésticos

Hospedador	Síndrome de la enfermedad
Ganado	<ul style="list-style-type: none"> • Subclínico con o sin leptospiuria • El síndrome de caída de producción láctea, con o sin otros signos clínicos (a menudo Hardjo) • aborto y la mortalidad neonatal: “tormentas” de aborto (Pomona) y abortos esporádicos (Hardjo) • La hemoglobinuria, ictericia y fiebre en los terneros, y con menos frecuencia, en los adultos jóvenes. Los serovares comúnmente involucrados son: Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. De vez en cuando, algunos animales muestran signos de meningitis
Cerdos	<ul style="list-style-type: none"> • subclínico, a menudo con leptospiuria (especialmente Pomona) • Fiebre y mastitis focal no supurativa y leptospiuria • Infertilidad, abortos y mortinatos (Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae o Bratislava) • Fiebre, anorexia, ictericia, hemoglobinuria y alta mortalidad en cerdos jóvenes (a menudo Icterohaemorrhagiae)
Perros	<ul style="list-style-type: none"> • subclínico con leptospiuria (a menudo Canicola) • Enfermedad hemorrágica aguda: fiebre alta, vómitos, postración y muerte a menudo precoz (generalmente Icterohaemorrhagiae) • La insuficiencia renal aguda (muchos serotipos incluidos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa y Bratislava) • Infertilidad, abortos y mortinatos (Bratislava)
Caballos	<ul style="list-style-type: none"> • iridociclitis recurrente ('oftalmía periódica "o" ceguera de la luna'), que puede causar ceguera • Ocasionalmente aborto con fetos de seis meses a término • En raras ocasiones fiebre, anorexia, depresión e ictericia
Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> • infecciones subclínicas Principalmente con leptospiuria (serotipos como Hardjo) • En ocasiones, leptospirosis aguda con depresión, disnea, hemoglobinuria, anemia y alta mortalidad en los corderos (a menudo Pomona)

Fuente: Markey, *et al.*, 2013)

2.2.3.1 Leptospirosis canina

La severidad de la enfermedad en perros, se encuentra relacionada con la virulencia del serovar infectante y la susceptibilidad del hospedador (Quinn *et al*, 2002). Los perros de ambos sexos de cualquier raza y edad pueden desarrollar leptospirosis. Los perros pastor machos de mediana edad, los sabuesos, los perros de trabajo y las razas cruzadas presentan un mayor riesgo que los perros de compañía menores de 1 año (Ward *et al.*, 2002).

La mayoría de los perros tiene una infección subclínica. Los perros con enfermedad clínica peraguda se presentan normalmente para evaluación con anorexia, depresión, hiperestesia muscular generalizada, taquipnea y vómitos (Nelson y Couto, 2010). La fiebre, las mucosas pálidas y la taquicardia están normalmente presentes. Frecuentemente aparecen petequias, equimosis, melena y epistaxis por la trombocitopenia y la coagulación intravascular diseminada. Las infecciones peragudas pueden progresar rápidamente hasta la muerte antes de reconocerse la marcada enfermedad renal o hepática (Nelson y Couto, 2010).

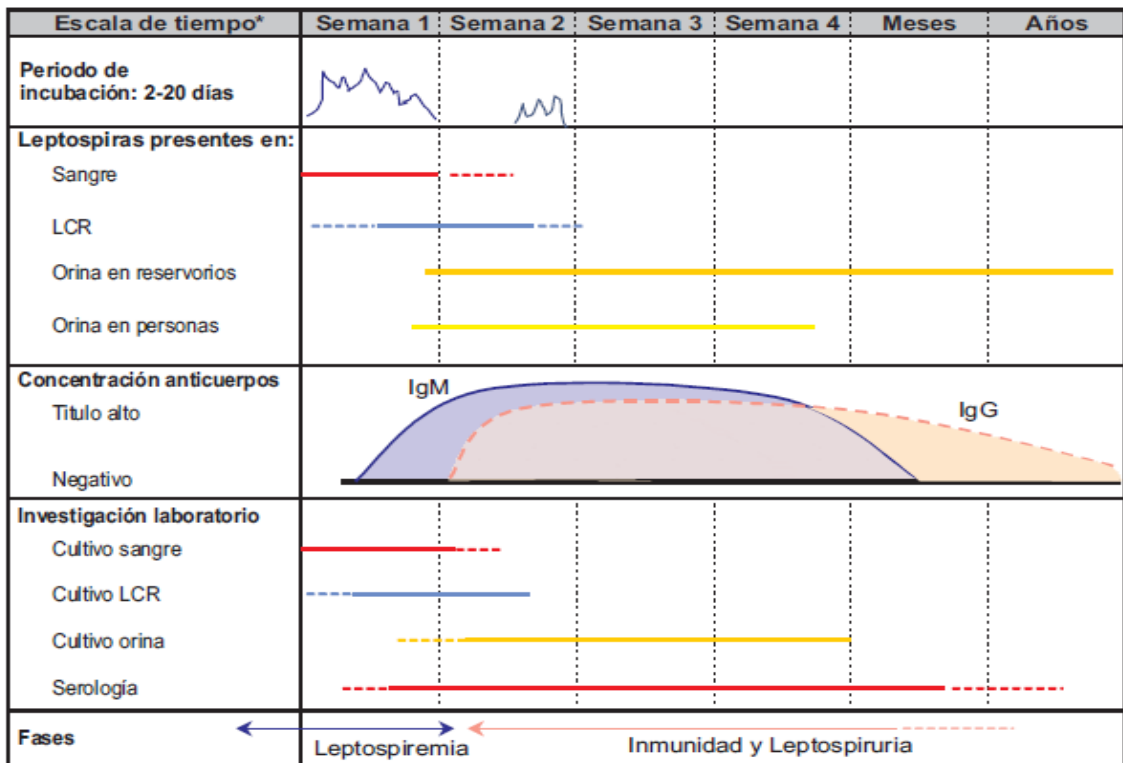
En los perros con infección subaguda son comunes la fiebre, la depresión y los signos clínicos o hallazgos en el examen físico compatibles con síndromes hemorrágicos, enfermedad hepática, enfermedad renal o una combinación de enfermedad hepática y renal. Pueden darse ocasionalmente conjuntivitis, panuveítis, rinitis, tonsilitis, tos y disnea. Durante la fase subaguda puede desarrollarse un fallo renal oligúrico o anúrico. Los hallazgos clínicos varían según el serovar infectante (Goldstein *et al.*, 2006).

Se ha discutido sobre la emergencia de la leptospirosis canina en Norte América y Canadá asociada con los serovares Pomona y Grippotyphosa así como el descenso de los casos asociados con los serovares Icterohaemorrhagiae y Canicola (Ward, 2002; Levett, 2004, Silva y Riedemann, 2007). Se sugiere que la disminución de los casos asociados con estos dos serovares está relacionada con la vacunación continuada de las poblaciones caninas con la vacuna bivalente que los incluye, que induce inmunidad específica para éstos, pero que puede favorecer la presencia potencial de otros serovares en las poblaciones caninas susceptibles (Ward, 2002; André-Fontaine, 2006).

2.3. Diagnóstico microbiológico

Es importante conocer qué tipo de muestras tomar, que pruebas realizar y cuando realizarlas (ver cuadro 8), para ello se necesita conocer la cinética de la enfermedad (ver figura 4) (Picardeau, 2013). La primera etapa de la leptospirosis es la septicémica o la fase aguda, que dura de 3 a 10 días. Durante esa etapa, las leptospiras se encuentran en la sangre en un número cada vez menor, hasta 15 días después del inicio de los síntomas (Barthi *et al.*, 2003; Agampodi *et al.*, 2012). Las muestras pueden recogerse hasta 2 días después de iniciada la antibióticoterapia para detectar las leptospiras. La segunda etapa, o etapa inmune, generalmente se produce durante la segunda semana después de la aparición de los síntomas, y tiene una duración de 4 a 30 días. Durante esta etapa, el aumento del título de anticuerpos se correlaciona a la eliminación de leptospiras de la sangre (Levett, 2001; Reis *et al.*, 2008; Brett y Lipnick, 2009). Las leptospiras también pueden detectarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) 10 días después de la aparición de los síntomas (Levett, 2001; Goris *et al.*, 2012).

Figura 4: Cinética de la leptospirosis (Fuente: Céspedes *et al.*, 2006)



La eliminación de leptospiras en la orina se inicia en la segunda semana de la enfermedad y tiene una duración de 4 a 6 semanas (Gsell y Mohr, 1968), aunque leptospiruria de varios meses se han reportado en humanos (Jhonson, 1950). La eliminación de microorganismos por orina puede ser larga e intermitente después de la infección inicial incluso en perros recuperados. La vida media de la bacteria en la orina es corta (Rodríguez *et al.*, 2005; Greene *et al.*, 2012).

Cuadro 8. Diagnóstico de laboratorio de leptospirosis canina

Ensayo	Tipo de muestra	Objetivo	Rendimiento
Microscopía de campo oscuro	orina	Leptospiras	La baja sensibilidad y especificidad. Requiere una considerable experiencia técnica para interpretar correctamente.
Cultivo	Sangre entera, orina	Leptospiras	Baja sensibilidad. Medios especiales y los tiempos de incubación prolongados requeridos. Difícil y no están ampliamente disponibles. El tratamiento antimicrobiano puede conducir a resultados falsos negativos. Actualmente el único método que permite la identificación precisa serovar.
Serología (MAT)	Suero	Anticuerpos contra varios serotipos de leptospiras	Los resultados falsos negativos pueden ocurrir temprano en el curso de la enfermedad o con inmunosupresión. Los falsos positivos pueden ocurrir con un historial de vacunación o con la exposición anterior. Los títulos pareados realizadas en el mismo laboratorio en es necesaria para el diagnóstico. Se puede producir variación interlaboratorios en los resultados.
PCR	sangre, orina, muestras de tejido	ADN leptospiral	La sensibilidad y la especificidad incierta y pueden variar entre los ensayos que ofrecen los distintos laboratorios. El tratamiento antimicrobiano puede conducir a resultados negativos de PCR en sangre.

Fuente: Sykes, 2014

2.3.1. Detección directa

Durante la fase aguda de la leptospirosis se pueden observar de 10^2 a 10^6 leptospiras/ml de sangre (Agampodi *et al*, 2012). El umbral de detección es de cerca de 10^4 leptospiras/ml de sangre en el examen directo. (Picardeau, 2013). En teoría, la leptospirosis puede ser diagnosticada mediante este método en sangre durante la primera semana después de la aparición de los síntomas, pero se requiere de un microscopio de campo oscuro y existe un relevante riesgo de falsos positivos debido a los desechos celulares y otros artefactos (Vijayachari *et al.*, 2001)

2.3.2. Aislamiento

La Sociedad Internacional de Leptospirosis, en su guía para el diagnóstico recomienda el aislamiento del agente a partir de muestras de sangre, orina, leche y en suspensiones de tejidos como riñón, médula ósea e hígado de animales afectados realizando el cultivo en agar semisólido de Fletcher y en el caldo EMJH (Ellinghausen, Mc Cullough, Jonson, Harris) (Terpstra *et al.*, 2006). Las leptospiras pueden aislarse de sangre y de líquido cefalorraquídeo hasta los diez días de iniciada la enfermedad (fase septicémica o leptospirémica) y de orina desde la segunda hasta la cuarta semana de enfermedad, fase de leptospiuria. (Céspedes *et al.*, 2006). Los cultivos se incuban en oscuridad a 28 - 30°C y se examinan semanalmente por microscopía de campo oscuro hasta la semana 13 antes de ser descartados. Sin embargo el aislamiento presenta una baja sensibilidad (Vijayachari y Sehgal, 2006; Musso y La Scola, 2013).

2.3.3. Diagnóstico serológico

La Organización Mundial de la Salud ha designado la técnica de microaglutinación (MAT), como la técnica de referencia o técnica de oro para los estudios de diagnóstico de la leptospirosis (OIE, 2014, OMS, 2008; W.H.O, 2009). Esta se emplea para detectar anticuerpos contra leptospiras en el suero, permite la identificación y clasificación de los aislamientos de *Leptospiras* spp y también sirve de base para evaluar cualquier otro método serológico nuevo para el diagnóstico de la enfermedad (Ooteman *et al.*, 2006).

La MAT no puede diferenciar entre anticuerpos aglutinantes ocasionados por infección actual, reciente o pasada. Idealmente se deben analizar dos muestras consecutivas de suero para observar seroconversión o aumento de los títulos de cuatro veces o más (Céspedes, 2005). El significado del título de una sola muestra es debatido y varía por área, por lo que diferentes títulos o puntos de corte pueden ser aplicados. Algunos consideran títulos de 1/100 positivos, otros aceptan títulos 1/200, 1/400 o 1/800 para el diagnóstico de leptospirosis actual o reciente (Wagenaar *et al.*, 2002).

Desde la década de 1960, el diagnóstico de leptospirosis en el Perú se realiza por medio de cultivo y microaglutinación (MAT) en muestras de sangre, suero, orina y tejidos; sin embargo, estas pruebas de diagnóstico presentan una serie de dificultades. El cultivo tiene una sensibilidad baja debido a las exigencias nutricionales, pH y características intrínsecas de la bacteria que al final repercute en un bajo porcentaje de aislamiento; mientras que la microaglutinación (MAT) requiere del mantenimiento de un cepario que es costoso (Céspedes *et al.*, 2006).

Métodos serológicos convencionales tales como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ampliamente utilizados para el diagnóstico de leptospirosis, pero la especificidad y sensibilidad de estos son bastante variables. A pesar de los pobres resultados del ELISA, varios autores han informado que los anticuerpos contra leptospiras podrían ser detectados antes con esta prueba que con la MAT (Cumberland *et al.*, 1999; Levett, 2001; Bajani *et al.*, 2003; Doungchawee *et al.*, 2008; Aviat *et al.*, 2010; Limmathurotsakul *et al.*, 2012). Anticuerpos Ig M se pueden detectar de 4 a 5 días después de la aparición de los síntomas, antes de la detección de Ig G y de anticuerpos aglutinantes, y persisten al menos 5 meses en los pacientes (Silva *et al.*, 1995). Elisa positivo no da ninguna indicación sobre el serovar/serogrupo infectante y no es suficiente para diagnosticar un caso de leptospirosis; que debe ser confirmada por MAT, PCR, o cultivo (Picardeau, 2013).

2.4. Diagnóstico molecular

Las técnicas moleculares más utilizadas son las que se realizan mediante la detección de genes propios de especies patógenas; siendo rápidas, sensibles y específicas pudiendo utilizarse para la identificación de la enfermedad en estadios tempranos de la misma. Las técnicas empleadas son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual tiene la capacidad de amplificar de forma exponencial y específica una secuencia determinada del ADN (Vijayachari y Sehgal, 2006). Otro método usado en el diagnóstico molecular es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Picardeau, 2013).

2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El método de PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta valiosa para el diagnóstico de patógenos bacterianos en los laboratorios de microbiología clínica por su excelente sensibilidad y especificidad (Espy *et al.*, 2006). Además de tener mayor nivel de detección que el cultivo bacteriano, puede detectar el ADN de los microorganismos lisados o inactivos. En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser mediante agentes intercalantes como SYBR Green que proporciona una detección sensible, pero es menos específico que la detección utilizando tecnología de sondas de hibridación tales como las sondas TaqMan (Limmathurotsakul *et al.*, 2012; Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013).

Varios protocolos de PCR convencional y PCR en tiempo real han sido desarrollados para la detección de leptospiras patógenas, estos protocolos incluyen el uso de genes universalmente presentes en bacterias como *gyrB*, *rrs* (gen rRNA 16S), *seg Y*; o genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira* spp. como *LipL32*, *LFB1*, *Liga* y *ligB2* (Slack *et al.*, 2006; Smythe *et al.*, 2002; Merien *et al.*, 2005; Palaniappan *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2009), pero sólo unos pocos han sido validados clínicamente (Slack *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Thaipadungpanit *et al.*, 2011; Villumsen *et al.*, 2012). En los últimos años, la PCR ha sido cada vez más utilizada para el diagnóstico de la

leptospirosis, e incluso tiende a reemplazar los métodos serológicos en zonas endémicas debido a su sensibilidad y capacidad de dar un diagnóstico precoz, es decir durante la etapa aguda de la enfermedad antes de que los anticuerpos sean detectables (Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013).

PCR detecta leptospiras en sangre durante los primeros 5-10 días después de la aparición de la enfermedad, hasta el día 15 (Musso y La Scola, 2013). Inclusive permite la detección de leptospiras en la sangre de un cultivo negativo en pacientes que han recibido un medicamento antimicrobiano eficaz, pero que no ha eliminado al organismo no viable (Boonsilp *et al.*, 2011). La carga bacteriana se puede obtener si se incluye un panel de ADN estándar (curva estándar). Sin embargo, actualmente no hay correlación entre la carga bacteriana detectado en la sangre y el pronóstico del paciente (Truccolo *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 2005; Agampodi *et al.*, 2012).

La técnica de PCR puede identificar las bacterias solo a nivel de especie y por lo tanto su valor epidemiológico es reducido en este aspecto, ya que no identifica a los serovares causantes de los brotes en una región determinada. Sin embargo, su valor epidemiológico es alto en la detección de los portadores crónicos, que eliminan leptospiras por orina, reconocimiento que no puede ser realizado por las pruebas diagnósticas actualmente vigentes (OMS, 2008; Cerqueira y Picardeau, 2009). Por otro lado, el diagnóstico que proporciona la PCR es potencialmente importante, porque el tratamiento con antibióticos es más beneficioso cuando se inicia pronto en el curso de la enfermedad (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Se han realizado varios estudios para la detección directa de leptospiras en muestras clínicas de animales mediante la técnica de PCR, tales como: Orina (Magajevski *et al.*, 2005; Bomfim y Koury, 2006; Lilenbaum *et al.*, 2009), semen y fluidos vaginales (Magajevski *et al.*, 2005; Lilenbaum *et al.*, 2008), tejidos renales en porcinos (Fearnley *et al.*, 2008), humor acuoso en equinos (Faber *et al.*, 2000). En 2010 Rojas *et al.* detectaron y cuantificaron leptospiras patógenas en orina de perros mediante PCR en tiempo real.

El umbral de detección es por lo general de 10 a 100 leptospiras/ml de sangre u orina (Smythe *et al.*, 2002, Slack *et al.*, 2006; Stoddard *et al.*, 2009, Bourhy *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio consistió en estandarizar e implementar una técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan para detectar la presencia de cepas de leptospiras patógenas en muestras de orina de caninos domésticos, para ello se infectó experimentalmente con cultivos de leptospiras vivas provenientes del Instituto Pasteur de Francia, las orinas de un canino donador clínicamente sano y negativo serológicamente a leptospirosis.

3.1. Lugar de estudio

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria Sección Bacteriología, Unidad de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) con sede en Lima.

3.2. Muestras

- Orinas de caninos domésticos
- Cultivos de leptospiras en medio EMJH

- Cultivos en agar sangre de otros géneros bacterianos Gram positivos y Gram negativos.

3.3. Materiales y Equipos

- Flujo laminar **LABCONCO** (Bioseguridad tipo II).
- Termociclador **PTC 200** (MJ Research)
- Lector de emisión de fluorescencia **Chromo-4™** (BIORAD)
- Equipo de electroforesis **SIGMA ALDRICH** Modelo SHU 13
- Microcentrífuga **Eppendorf 5702/ IEC Micromax RF**
- Vortex **VWR SCIENTIFIC INDUSTRIES** Modelo K550 G
- Estufa **PRECISION Thelco** (Modelo 6, Rango de T° hasta 60°)
- Baño María **Memmert** (Modelo Shutzart DIN 40050-IP 20)
- Transiluminador **ULTRA LUM PATENTE 5434478**
- Máquina fabricadora de hielo **SCOTSMAN - FRIMONT**
- Espectrofotómetro **UNICO 2100**
- Micropipetas **Eppendorf** de 1000, 100 y 10 µl.
- Viales **Eppendorf** estériles de 1,5 ml, 0,5 ml y 0,2 ml
- Puntas de micropipeta estériles **Eppendorf** de 1000, 100 y 10 µl.
- Microscopio de campo oscuro **NIKON**
- Potenciómetro **HANNA** (Modelo HI 824)
- Gradillas
- Criogradillas
- Tubos blancos estériles para PCR
- Frascos de vidrio autoclavados.
- Guantes de nitrilo

3.4. Reactivos

- Kit de extracción de ADN: Wizard® Genomic DNA Purification kit-**Promega**
- GoTaq® Probe qPCR Master Mix de **Promega**

- Cebadores (Lepto R y Lepto F) **IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES)**
- Sondas TaqMan **IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES)**
- Agua libre de nucleasas **IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES)**
- Lisozima **Merck** (50 mg/ml)
- Proteínasa K **Merck** (10 mg/ml)
- Etanol absoluto **EMSURE®**
- Isopropanol **EMPARTA®**
- Tampón fosfato salino (PBS) 10x **OmniPur®**
- Agarosa **SIGMA**
- Buffer TAE 50 x **Thermo SCIENTIFIC**
- Marcador de peso molecular **GeneOn**
- Colorante Sybr safe **life technologies™**
- EDTA 50 mM
- Buffer de carga
- Suero fisiológico

3.5. Estandarización de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan para la detección genética de cepas patógenas de *Leptospira* spp.

3.5.1. Extracción de ADN

El primer paso fue optimizar los protocolos de extracción de ADN bacteriano, a partir de cultivos de leptospiras en caldo EMJH; y en muestras de orina previamente infectadas de manera experimental con cepas patógenas de *Leptospira* spp., procedentes de perros sanos (Negativo a leptospirosis a través de una evaluación clínica y serológica).

3.5.1.1. Extracción de ADN de cultivos de leptospiras en EMJH.

Para la extracción de ADN se utilizaron cultivos vivos de cada serogrupo patógeno de los 25 establecidos de *Leptospira* spp. y una cepa saprófita de *Leptospira biflexa*

(Ver cuadro 9). Estas cepas fueron obtenidas de la Unidad de Espiroquetas del Instituto Pasteur (Paris, Francia). Los cultivos fueron utilizados a los 5-7 días de crecimiento con una D.O de 0.2 a 0.35 medidos a una longitud de onda de 420 nm.

Cuadro 9. Serovares de *Leptospira* spp utilizados para la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-bratislava
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
4	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
6	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
7	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 c
8	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
9	<i>L. kirshneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
10	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
11	<i>L. fainei</i>	Hurtsbridge	Hurtsbridge	BUT6
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
13	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR10
14	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
16	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945
16	<i>L. interrogans</i>	Manhao	Lincang	L14
17	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
18	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
19	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
20	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
21	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
22	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
23	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
24	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
25	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
26	<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1

El ADN de los cultivos de EMJH fue extraído utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, realizando modificaciones al protocolo base diseñado por el fabricante (Ver cuadro 10). Los productos obtenidos fueron almacenados a -20° hasta su utilización (Ver protocolo completo en el anexo 1)

Cuadro 10. Modificaciones realizadas al protocolo base para la extracción de ADN de *Leptospira* spp. de caldo EMJH

Modificación	
Adición de una enzima lítica a mayor concentración	Se utilizó enzima lisozima a una concentración de 50 mg/ml
Cambio en velocidades y tiempos de centrifugación	Se utilizaron velocidades de 4500 RPM y 16 000 g a 20 y 25 min. respectivamente

3.5.1.2. Extracción de ADN de leptospiras en orinas infectadas experimentalmente de caninos domésticos.

Se obtuvieron 5 muestras de orina (una muestra cada mes) de un canino doméstico (*Canis lupus familiaris*) sano, menor de 1 año de edad, sin signos clínicos compatibles con leptospirosis, negativo a la prueba de microaglutinación (MAT) y sin crecimiento bacteriano en el urocultivo. La muestra fue tomada en frasco estéril directamente del animal durante la micción, esperando que se eliminen los primeros chorros de orina.

Las orinas se infectaron con una cantidad inicial de 10^8 leptospiras patógenas. Esto debido a que se han reportado concentraciones de leptospiras en orina hasta un nivel de 10^8 /ml de orina (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Para obtener esa cantidad de leptospiras se utilizó la equivalencia entre número de leptospiras y densidad óptica, tomando como referencia que una concentración de 7×10^8 leptospiras/ml de EMJH es equivalente a una densidad óptica de 0,2 - 0,35 a 420 nm de longitud de onda (Louvel y Picardeau, 2007; INS, datos no publicados).

Para ello se sembró 500 µl de cultivo fresco de los serogrupos patógenos Ballum y Autumnalis de las especies *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*, respectivamente, en 5 ml de medio EMJH. Los cultivos se incubaron por 5 días hasta obtener una DO_(420nm) entre 0,2 y 0,35. Posteriormente se procedió a infectar las orinas de la siguiente manera:

Muestra	Volumen (Concentración inicial)	orina	Concentración final
Orina + <i>L. borgpetersenii</i> Serogrupo Ballum	100 µl (10 ⁸ –cultivo puro)	+ 900 µl	10 ⁷
	100 µl (10 ⁷)	+ 900 µl	10 ⁶
	100 µl (10 ⁶)	+ 900 µl	10 ⁵
	100 µl (10 ⁵)	+ 900 µl	10 ⁴
	100 µl (10 ⁴)	+ 900 µl	10 ³
	100 µl (10 ³)	+ 900 µl	10 ²
	100 µl (10 ²)	+ 900 µl	10 ¹
	100 µl (10 ¹)	+ 900 µl	10 ⁰

Este protocolo de infección de orinas, se repitió por cuatro veces más, utilizando las cuatro orinas restantes, permutando la infección con los serogrupos mencionados. Posteriormente se probaron diferentes tiempos y velocidades de centrifugación, hasta optimizarlo a una velocidad de 16000 g por 25 minutos. El ADN de las orinas infectadas fue extraído utilizando el protocolo previamente optimizado (Ver protocolo completo en el Anexo 2).

3.5.1.3. Extracción de ADN de otros géneros bacterianos

Para evaluar la especificidad de la técnica de PCR para la detección de *Leptospira* spp. se utilizaron otros géneros bacterianos. Para ello, se cultivaron cepas patrón de los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Pasteurella* y *Escherichia* (Ver Cuadro 11). La extracción de ADN se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega (Ver anexo 3).

Cuadro 11. Otros Géneros bacterianos utilizados en la estandarización de la PCR en tiempo real con sondas TaqMan

Especie	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pasteurella multocida</i>	NE 49

3.5.2. Evaluación de ADN extraído

El producto de ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (INVITROGEN) por electroforesis a 90V durante 60 minutos y visualizado en el Transiluminador. Para la corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular de 50 – 3000 bp (GENEON, Alemania).

3.5.3. Cebadores utilizados en la técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan

Se utilizaron los cebadores Lepto R y Lepto F, específicos para *Leptospira* spp, y la sonda TaqMan Lepto probe, que amplifican y se hibridan en una porción del gen *rrs*, capaces de diferenciar entre especies patógenas y no patógenas, publicados en un ensayo por Smythe *et al.* (2002) (ver cuadro 12). Se realizó un análisis informático BLAST de comparación de secuencia de los cebadores y sonda con las secuencia genómicas de diferentes tipos bacterianos disponibles en el GenBank. El gen *rrs* codifica la síntesis del fragmento 16S del ARNr y presenta una región específica presente solo en leptospiros patógenas.

Cuadro 12. Cebadores y sonda utilizados en la estandarización de PCR en tiempo real para la detección de leptospiros patógenas

Cebadores/ Sonda	Secuencia	Longitud del amplicon
Lepto F	5 ⁻¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG 3'	87 bp
Lepto R	5 ⁻²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{A/G} ACAC 3'	
Lepto probe	5 ⁻²⁰⁵ (FAM)CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC ²²⁸ 3'(TAMRA)	

3.5.4. PCR en tiempo real con sondas TaqMan

Durante la estandarización, se utilizó ADN extraído de los 25 serogrupos patógenos como controles positivos, en diluciones de 10⁷ – 10⁰ con agua ultrapura, para

determinar el grado de precisión de la prueba. La especie saprófita *L. biflexa* y los otros géneros bacterianos, fueron utilizados como controles negativos.

Para preparar el mix de PCR se utilizó el GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega junto con los cebadores Lepto F, Lepto R y Lepto probe, agua ultrapura y ADN molde. El volumen de reacción fue de 20µl, donde el molde de ADN representó el 10% del volumen total (2µl). La mezcla de los componentes (sin incluir el ADN) se preparó en un vial de microcentrífuga estéril libre de nucleasas. La proporción de los reactivos en la elaboración de la mezcla de reacción se pueden observar en la cuadro 13.

Cuadro 13. Concentración de reactivos para la PCR en tiempo real

Componentes	Concentración final	Volumen (20µl)
Master mix Go Taq (2x)	1x	10,0 µl
Lepto F (74.3 nM)	0,03 µM	0,15 µl
Lepto R (104,4 nM)	0,03 µM	0,15 µl
Lepto probe (45,6 nM)	0,02 µM	0,10 µl
Agua libre de nucleasas	-	7,60 µl
ADN		2,00µl
Volumen total		20 µl

Posteriormente se colocó 18 µl de esta mezcla en los tubos para PCR, adicionándole 2 µl de ADN para completar el volumen a 20 µl. Los tubos fueron tapados y llevados al termociclador e incubados siguiendo el protocolo del cuadro 14.

Cuadro 14: Protocolos de qPCR para la detección de *Leptospiras* patógenas

Proceso	temperatura	tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Alineamiento/Extensión	60°C	1 minuto
Protocolo 1: Se realizó por 40 ciclos y se mantuvo a 8°C, hasta su evaluación y análisis.		
Protocolo 2: Se realizó por 35 ciclos y se mantuvo a 8°C, hasta su evaluación y análisis.		
Protocolo 3: Se realizó por 30 ciclos y se mantuvo a 8°C, hasta su evaluación y análisis.		

3.6. Análisis de los resultados

Para la determinación de los resultados se analizaron los valores de Ct (ciclo de amplificación) obtenidos mediante el software Opticon Monitor 2 v2.0.3.

La Eficiencia de la amplificación promedio (E) fue determinada a partir de la pendiente obtenida de las concentraciones producidas por triplicado para el experimento utilizando la ecuación: $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$

IV. RESULTADOS

Se realizó un estudio para estandarizar una técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan para detectar la presencia de leptospiras patógenas en muestras de orina de caninos domésticos sospechosos de leptospirosis.

4.1. Extracción de ADN

La electroforesis en agar gel reveló la presencia de bandas de ADN genómico en todas las cepas utilizadas, siguiendo el protocolo de extracción que incluye lisozima a una concentración de 50mg/ml.

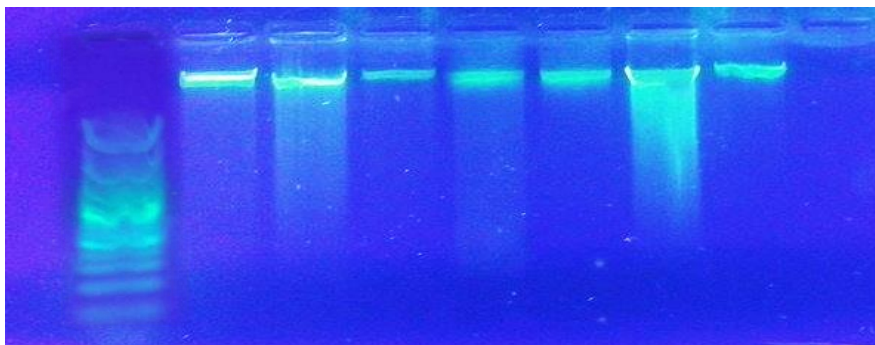


Figura 5. Electroforesis de extracción de ADN leptospiral. Carril 1, Ladder de GENEON de 50 - 1500 pb; carril 2, (*Staphylococcus aureus*); carril 3, (*Escherichia coli*); carril 4-8, ADN leptospiral; carril 9, control negativo (agua ultrapura).

4.2. Estandarización de la PCR en tiempo real

4.2.1. Especificidad de la técnica PCR en tiempo real

Para evaluar la especificidad de los cebadores y la sonda; 25 cepas de leptospiras patógenas, 1 cepa de leptospira saprófita y otros 5 patógenos bacterianos no leptospira fueron sometidos a PCR en tiempo real. Se observó un producto detectable para todas las 25 cepas de leptospiras patógenas, con un Ct promedio de 14,62. La cepa de leptospira no patógena y las otras cepas bacterianas no dieron productos de amplificación (Figura 6, Cuadro 15)

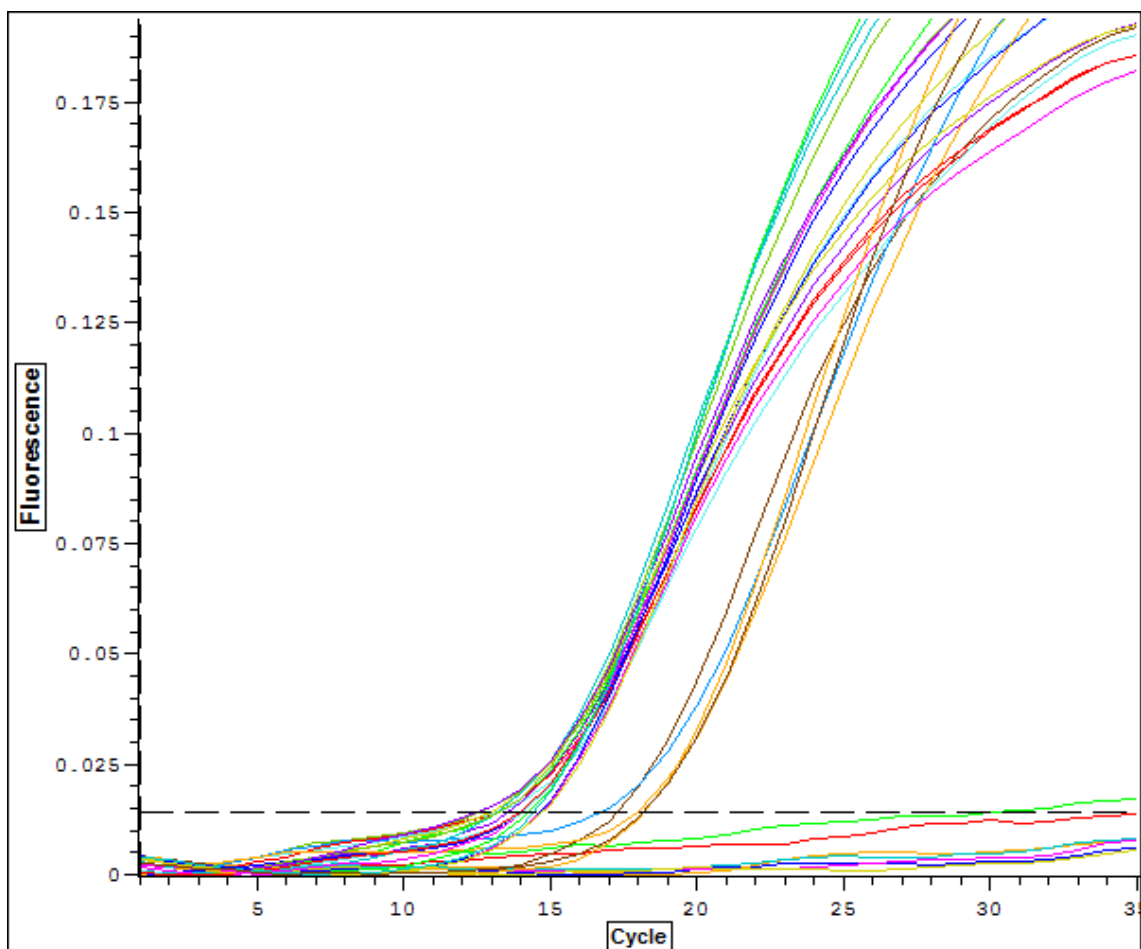


Figura 6. Gráfica de los valores de Ct en las 25 cepas patógenas de *Leptospira* spp. En la curva de amplificación se observa que los controles positivos presentan un valor de Ct promedio de 14.62 a diferencia del resto de controles negativos que no superan el umbral.

Cuadro 15. Valores de Ct de los productos obtenidos de 25 cepas patógenas de referencia, una cepa saprófita y otros géneros bacterianos

ADN total de controles bacterianos	CT	Resultado
<i>L. interrogans</i> Canicola	12.53	+
<i>L. interrogans</i> Australis	12.59	+
<i>L. interrogans</i> Pomona	13.05	+
<i>L. kischneri</i> Grippytyphosa	13.20	+
<i>L. interrogans</i> Autumnalis	13.21	+
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes	13.21	+
<i>L. interrogans</i> Hebdomadis	13.23	+
<i>L. licerasiae</i> Iquitos	13.25	+
<i>L. weilii</i> Celledoni	13.52	+
<i>L. kischneri</i> Cynopteri	13.99	+
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae	14.08	+
<i>L. santarosai</i> Shermani	14.08	+
<i>L. interrogans</i> Bataviae	14.09	+
<i>L. borgpetersenii</i> Ballum	14.09	+
<i>L. noguchii</i> Louisiana	14.25	+
<i>L. weilii</i> Sarmin	14.42	+
<i>L. santarosai</i> Mini	14.63	+
<i>L. borgpetersenii</i> Tarassovi	14.65	+
<i>L. fainei</i> Hurstbridge	14.72	+
<i>L. interrogans</i> Sejroe	16.41	+
<i>L. interrogans</i> Djasiman	16.73	+
<i>L. meyeri</i> Ranarum	17.29	+
<i>L. borgpetersenii</i> Javanica	17.98	+
<i>L. interrogans</i> Manhao	18.17	+
<i>L. noguchii</i> Panama	18.21	+
<i>L. biflexa</i> Semarang	N Ct	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	N Ct	-
<i>Pasteurella multocida</i>	N Ct	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	N Ct	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	N Ct	-
<i>Escherichia coli</i>	N Ct	-
N Ct: No hubo Ct		

4.2.2. Sensibilidad de la técnica PCR en tiempo real

Se realizaron diluciones seriadas de concentraciones bacterianas de leptospiras de 10^7 , hasta 10^0 , para obtener el estándar y evaluar el nivel de detección de cantidades de la técnica de PCR con sondas TaqMan en tiempo real. Se determinó que esta pudo detectar leptospiras patógenas (estándar) hasta una dilución de 10^0 , sin embargo, las diluciones de 10^1 y 10^0 , no produjeron una curva de amplificación completa. Mostrando una sensibilidad de detección de hasta una concentración bacteriana de 10^2 leptospiras/ml. Obteniéndose un valor de Ct de 29.97 (Figura 7, cuadro 16), en un protocolo de 30 ciclos.

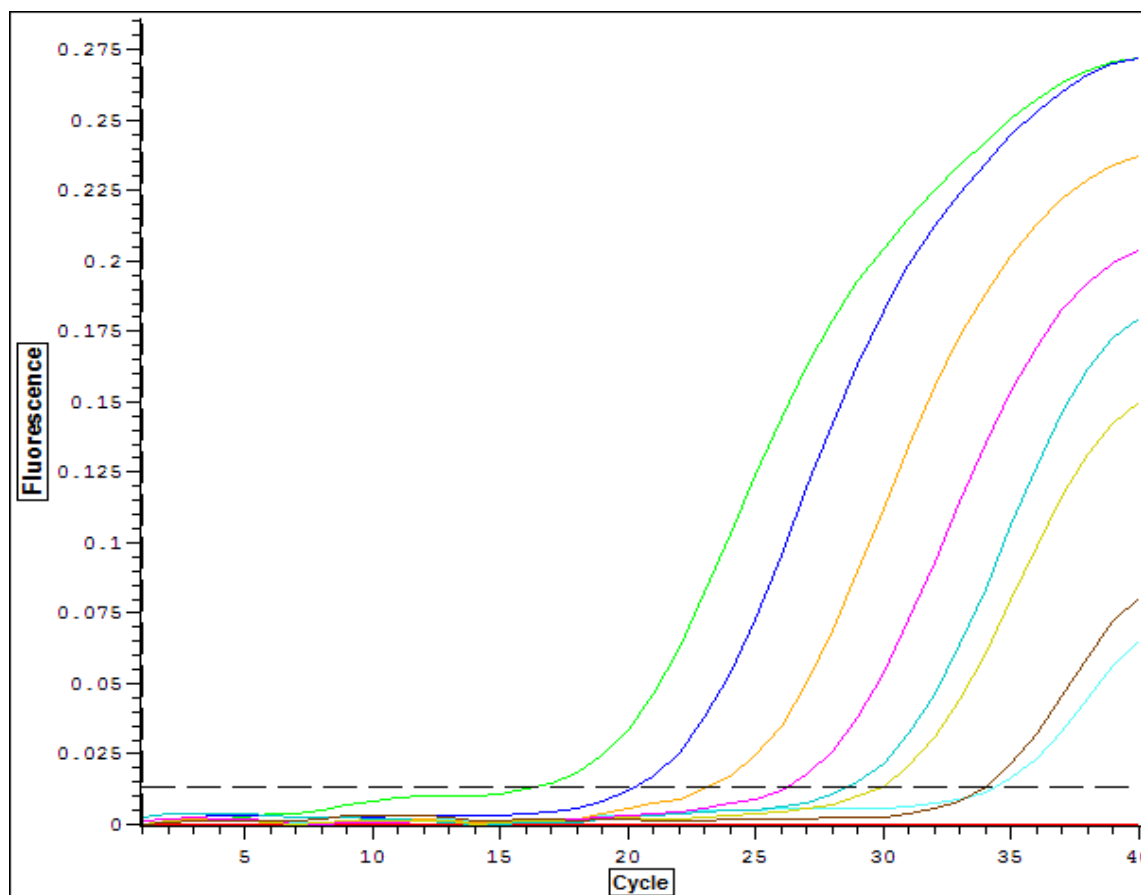


Figura 7. Gráfica de los valores de Ct de las diluciones de un serovar patógeno de *Leptospira* (serogrupo *Autumnalis*). Las líneas muestran amplificaciones de las diluciones del estándar desde 10^7 hasta 10^0 .

Cuadro 16. Valores de Ct de los productos obtenidos en la PCR tiempo real de las diluciones decrecientes de una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Autumnalis)

Diluciones de ADN de <i>L. interrogans</i> Autumnalis y ADN de controles negativos	CT
10 ⁷	16.49
10 ⁶	20.34
10 ⁵	23.21
10 ⁴	26.26
10 ³	28.62
10 ²	29.97
10 ¹	32.55
10 ⁰	34.05
<i>L. biflexa</i> Semarang	34.01
<i>Escherichia coli</i>	34.40

4.2.3. Detección de *Leptospira* spp patógena en orina

Para evaluar la capacidad de la PCR tiempo real de detectar la presencia de leptospirosis patógenas en la orina, se trabajaron con orinas infectadas experimentalmente en diluciones de 10⁷ a 10⁰, el límite estimado de detección fue hasta una concentración bacteriana de 10² leptospirosis/ml con un valor de Ct de 29.87 (Cuadro 17, figura 8).

Cuadro 17. Valores de Ct de los productos obtenidos en las diluciones decrecientes de las orinas infectadas con cepas patógenas de *Leptospira* (Serogrupo Ballum)

Diluciones de ADN de <i>L. interrogans</i> Autumnalis	CT
10 ⁷	17.54
10 ⁶	20.65
10 ⁵	22.44
10 ⁴	25.54
10 ³	27.43
10 ²	29.87
10 ¹	33.90
10 ⁰	34.45

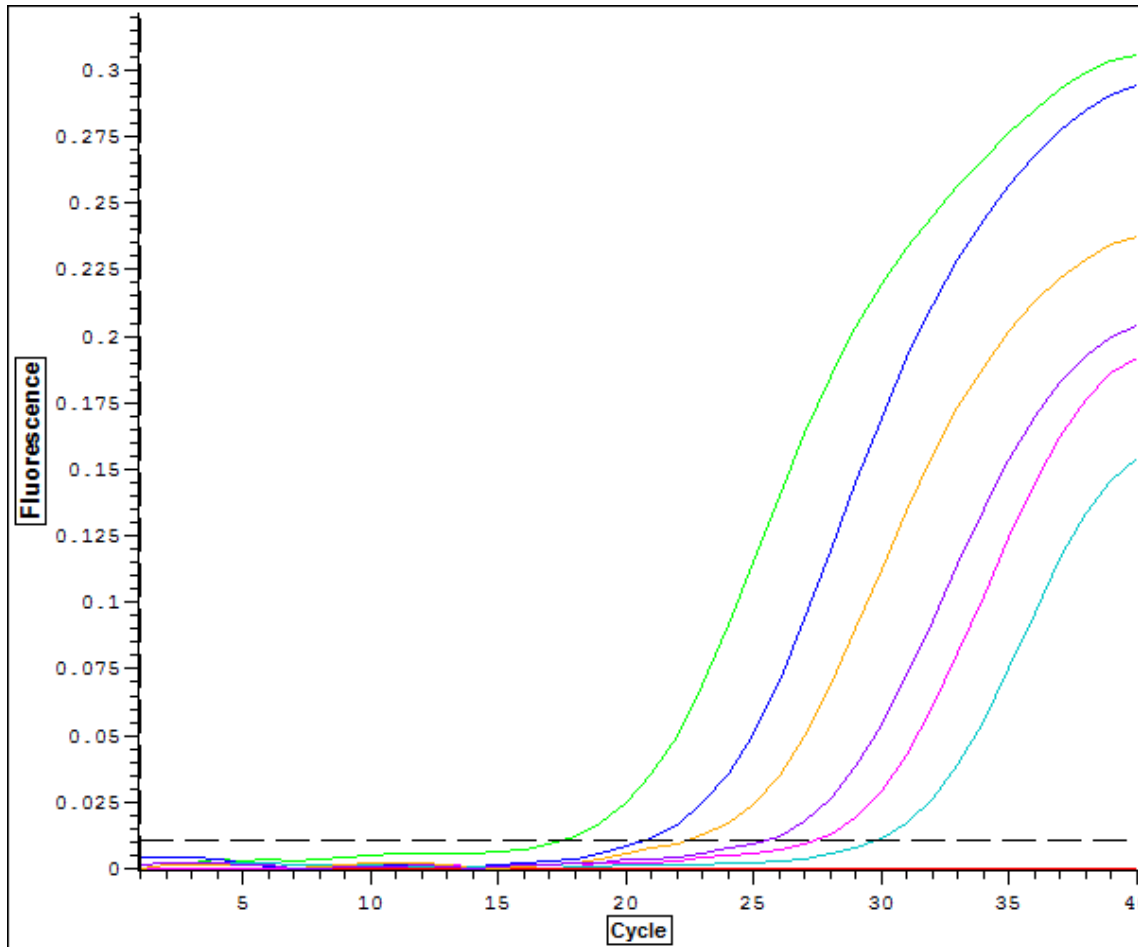


Figura 8. Gráfica de los valores de Ct de las diluciones de las orinas infectadas con una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Ballum). En la figura se observan las diluciones de 10^7 hasta 10^2 , siendo el límite de detección de 10^2 .

4.2.4. Eficiencia de la amplificación

La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$$

La pendiente fue de $-3,038$ lo que dio una eficiencia igual a $1,13$.

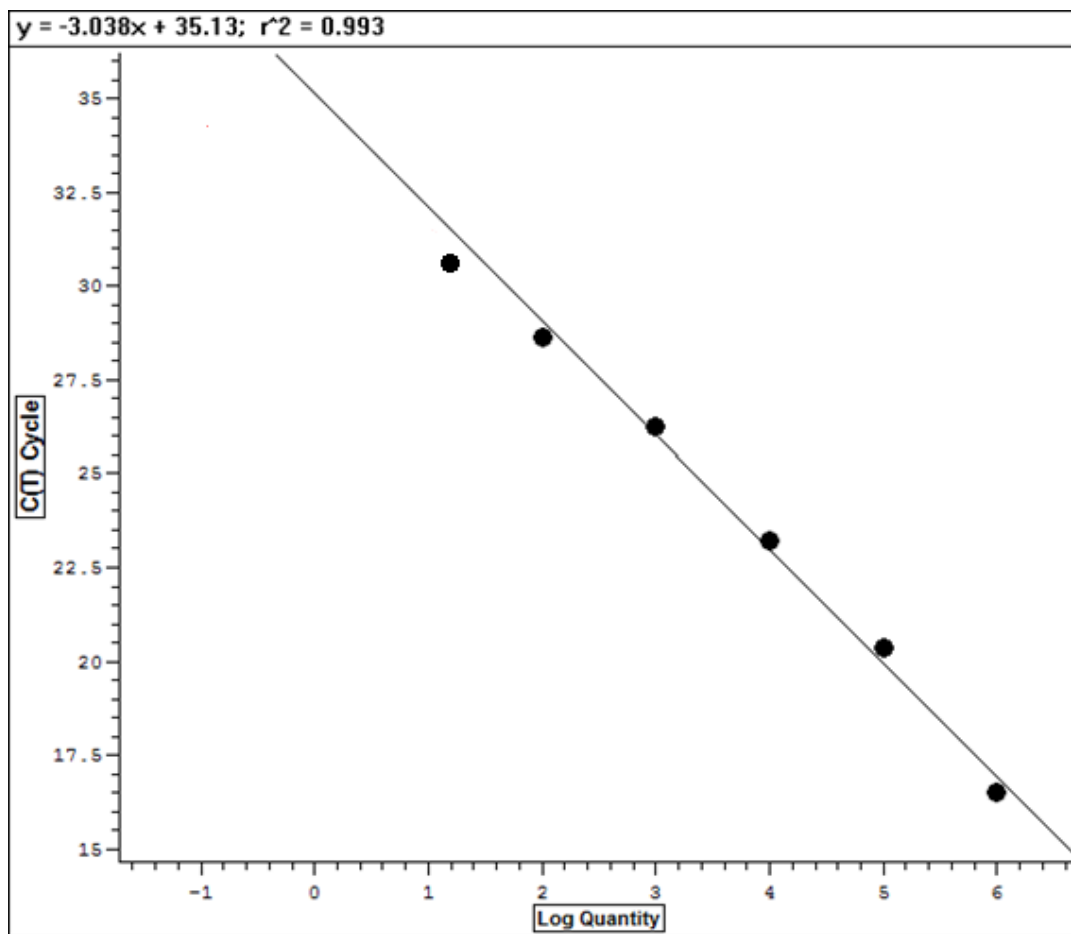


Figura 9. Gráfica de la curva de calibración del estándar (Serogrupo Autumnalis). En la figura se observa la curva estándar producida por los valores de Ct de las diluciones de 10^7 hasta 10^2 del estándar.

V. DISCUSIÓN

A pesar de los varios ensayos de PCR en tiempo real que se han descrito para el diagnóstico de la leptospirosis (Smythe *et al.*, 2002; Levett *et al.*, 2005; Merien *et al.*, 2005; Palaniappan *et al.*, 2005; Slack *et al.*, 2007; Roczek *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009; Stoddard *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010), sólo unos pocos de estos ensayos han sido validados para su uso diagnóstico en muestras de sangre (Ahmed *et al.*, 2009; Slack *et al.*, 2007; Smythe *et al.*, 2002). Solo un protocolo de PCR en tiempo real se ha validado para uso diagnóstico en muestras de orina canina, dicho ensayo se aplicó a 525 muestras de orinas de un albergue de perros, de los cuales 37 fueron positivos (Rojas *et al.*, 2010); hasta el momento ninguno ha sido validado para el uso como diagnóstico en humanos (Villumsen *et al.*, 2012).

La sedimentación de leptospiras para la extracción de ADN es un punto crítico en la optimización del protocolo de extracción. Por ello, se probaron protocolos de extracción con diferentes velocidades de sedimentación (5000 rpm por 15 minutos hasta 16000g por 25 minutos). Encontrándose que a mayor velocidad y tiempo de centrifugación se tuvo más éxito en la obtención del pellet para la extracción de ADN de las muestras. Esto ya ha sido descrito por otros autores donde se menciona que la obtención o proceso de extracción de ADN leptospiral es relativamente difícil debido a

que las leptospiras al ser muy finas no sedimentan fácilmente (Faine *et al.*, 1999; Picardeau *et al.*, 2001; Serrano, 2012).

Existen varios protocolos para la purificación de ADN leptospiral a partir de orina, los cuales coinciden en que es necesario un tiempo prudente y velocidad adecuada de centrifugación, como lo indican los protocolos de la OMS (2008), cuyo procedimiento sugiere centrifugar la muestra de orina por 30 minutos a 1600 g. Otros protocolos utilizan velocidades de centrifugación de 3000 g por 10 minutos (Bal *et al.* 1994) e incluso velocidades mayores de 13 000 g por 30 minutos para espiroquetas (Protocolo Biotoools, 2008). El estudio demostró que con una velocidad de centrifugación de 16000 g por 25 minutos, se obtuvo un pellet adecuado para la ejecución del protocolo de extracción.

Otros aspectos que se tuvieron en cuenta en la optimización de la extracción de ADN fue la ruptura de la membrana de la bacteria y el daño de los cristales presentes en la orina, dos inhibidores de la PCR fuertemente asociados en este tipo de muestras (Fonseca *et al.*, 2005). Para ello, se optimizó el protocolo de extracción utilizando una concentración de enzimas proteolíticas como lisozima y/o proteinasa K, asociado a un tratamiento con calor a 37°C. (Verkooyen *et al.*, 1996). Observándose que la extracción del ADN mejoró cuando se utilizó una concentración de Lisozima de 50mg/ml mientras que el tratamiento con proteinasa K no dio buenos resultados. Esto se relaciona con lo mencionado por Fonseca *et al.*, 2005 que describieron que existe un efecto inhibitorio de los cristales que contienen cationes divalentes, particularmente iones magnesio, los cuales tienen un efecto significativo sobre la actividad de la Taq polimerasa (Fonseca *et al.*, 2005).

Existen varias estrategias para eliminar los inhibidores de la PCR que se encuentran en la orina (Lisby *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 2005), ya que la presencia de estos afectan la amplificación y pueden llevar a resultados falsos negativos, por lo que es necesario estandarizar metodologías que permitan su remoción. Además de los cristales, existen otros inhibidores en orina como: exceso de urea, la hemoglobina y la presencia de hormonas como la beta gonadotropina coriónica, entre otros (National Chlamydia Laboratory Committee, 2003; Tam, 2003).

En el presente estudio de PCR se utilizó la tecnología TaqMan debido a que dentro de los métodos actuales basados en fluorescencia, esta es más específica en la detección (Merien *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995; Espy *et al.*, 2006). Los resultados de PCR en tiempo real en este estudio se basan en la lectura de la emisión de la fluorescencia a lo largo de la reacción (Walker, 2002). Esos datos de fluorescencia se adquieren cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (background). Este número de ciclo se llama ciclo umbral (Quinn *et al.*, 2011).

Los valores de Ct obtenidos mediante la PCR en tiempo real con sondas TaqMan durante la estandarización, fueron desde 12.53 hasta 18.21 para los 25 serovares patógenos de *Leptospira*, mostrando una diferencia clara con los controles negativos (*L. biflexa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) que no generaron amplificadas que excedieran el umbral, con el protocolo 3 (de 30 ciclos). Este valor es menor al hallado por Smythe *et al.* (2002) que obtuvieron valores de Ct entre 18.20 y 23.40 en 40 ciclos a partir de muestras de sangre de pacientes humanos (Smythe *et al.*, 2002). Estas variaciones pueden deberse a que las muestras analizadas por ellos procedían de sangre de humanos, mientras que las muestras de leptospiras que utilizamos en el presente estudio, provienen de cultivos de EMJH y de orinas, otros aspecto a considerar es el uso de kits de extracción, equipos de marcas y características distintas, y protocolos que pueden producir resultados variables.

La fluorescencia captada por el equipo corresponde a la que es emitida por el fluoróforo donador cuando este se encuentra libre, espacialmente alejado del fluoróforo receptor, producto de la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. Estos fluoróforos se encuentran marcando la sonda específica TaqMan *Lepto probe* utilizada en el estudio, la cual se hibridó a una región específica de 25 pares de bases localizada dentro del amplicón de 87 bp generado por los cebadores *Lepto F* y *Lepto R*, los cuales amplifican una parte del gen *rrs*. *Lepto F* y *Lepto R* reconocen este segmento que es propio del género *Leptospira*, no teniendo la capacidad de amplificar otros géneros bacterianos; mientras que, la sonda TaqMan está diseñada para hibridar a una

porción de este segmento del gen *rrs*, solo en las leptospiras patógenas. De esta manera, es capaz de diferenciar entre especies patógenas y no patógenas de *Leptospira* (Smythe *et al.*, 2002).

Las diluciones del estándar ($10^7 - 10^0$) fueron detectadas con unos valores de Ct desde 16.49, para la dilución de 10^7 , hasta 29.98 que corresponde a una dilución de 10^2 leptospiras. Este intervalo de 10^7 a 10^2 describió una curva de calibración con una eficiencia de 1,13 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0,993 que es lo óptimo para esta prueba (Wang *et al.*, 2012). Las diluciones de 10^1 y 10^0 con unos Ct de 34.05 y 34.40 respectivamente, fueron similares a los valores de Ct obtenidos de los controles negativos: 34.01 para *L. biflexa* y 34.40 para *E. coli* con una curva muy débil, en el protocolo 1 (de 40 ciclos).. Por todo esto se consideró que mediante el protocolo implementado se cuantifica la concentración de leptospiras hasta un orden mínimo de 10^2 , porque cuando la muestra estándar tiene un orden menor (10^1 y 10^0) el valor de R^2 es menor a 0,98; por lo tanto hay una mala correlación. Por esta razón, se optimizó el protocolo de PCR en 35 ciclos

El ADN leptospiral en muestras de orina infectadas experimentalmente fue detectado hasta en una dilución de 10^2 leptospiras con un valor de Ct de 29.87 que se encuentra en el rango de nuestro estándar, las diluciones de 10^1 y 10^0 no generaron productos específicos, con el protocolo 3 (de 30 ciclos). El presente protocolo puede detectar a partir de una concentración de 10^2 leptospiras/ml, el cual se determinó como el mínimo nivel de detección de la prueba. Sin embargo, este nivel de detección es menor al descrito por Smythe *et al.* (2002) quienes detectaron a partir de 10 leptospiras en orina.

Una muestra positiva por PCR revela la presencia de leptospiras patógenas en la muestra. Sin embargo, no tienen la capacidad de identificar directamente el serovar o serogrupo (Cerqueira y Picardeau, 2009). El análisis de los productos de amplificación por las curvas de fusión (Merien *et al.*, 2005) o secuenciación (Pérez y Goarant, 2010; Cerqueira *et al.*, 2010) puede permitir la identificación de las especies y, en algunos casos, el serovar o el genotipo. Sin embargo, como el presente estudio no utiliza las sondas con reporteros que no emiten y no permiten producir ninguna luminiscencia no

es posible realizar un análisis de la temperatura de disociación para evaluar los productos (Yao *et al.*, 2006).

Los protocolos de PCR en tiempo real, a partir de muestras de sangre, tienen un potencial diagnóstico que podría facilitar la detección temprana de leptospiras patógenas en pacientes que presentan síntomas clínicos sugestivos de leptospirosis, debido a que la enfermedad inicial no produce anticuerpos detectables por la prueba de aglutinación microscópica (MAT) que es el Gold estándar en el diagnóstico de esta enfermedad (Picardeau *et al.*, 2001). Además presenta una ventaja frente al cultivo que presenta una baja sensibilidad, aproximadamente del 30% y requiere de por lo menos dos meses para un resultado final (Musso y La Scola, 2013).

EL presente protocolo de PCR en tiempo real de detección de cepas patógenas de *Leptospira* spp tendría otra ventaja frente al MAT, con respecto a los animales portadores, que pueden estar clínicamente sanos y no producir anticuerpos detectables por MAT, pero si estar eliminando y diseminando la bacteria (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). Otro aspecto, es la detección de portadores vacunados, ya que estas no conducen a resultados positivos en la prueba de PCR en tiempo real. (Midence *et al.*, 2011).

Los resultados positivos con el presente protocolo como prueba diagnóstica, deben interpretarse siempre ligados a los signos y hallazgos clínicos. Además, pueden ocurrir resultados falsos negativos debido a que la leptospiuria aún no comienza o hay una pequeña concentración de leptospiras por la presencia de inhibidores de la orina (Greene *et al.*, 2012).

La capacidad de la PCR para distinguir entre especies patógenas y no patógenas puede ser útil para el ensayo de muestras ambientales. El representante de leptospira no patógena en este estudio fue la *L. biflexa*, que es el contaminante ambiental más comúnmente descrito y con frecuencia confunde la identificación de las cepas patógenas a partir de muestras ambientales. En condiciones especiales, es posible que el cultivo facilite la discriminación entre *L. biflexa* y las especies patógenas, sin embargo la PCR podría proporcionar un método alternativo o un apoyo para la identificación. De la misma manera contribuye como una prueba tamiz para la

caracterización de los aislamientos de leptospiras, que tiene como inconveniente la necesidad de equipos especializados y experiencia (Morey *et al.*, 2006).

VI. CONCLUSIONES

- La presente técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan permite detectar cepas patógenas del género *Leptospira* cuando se mezclan con orina de caninos domésticos.
- La presente técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan puede detectar cantidades hasta 10^2 leptospiros/ml.
- La velocidad y el tiempo de centrifugación son factores claves para el éxito en la extracción de ADN de *Leptospira* spp.
- *Leptospira* spp. a pesar de ser considerada una bacteria Gram – necesita enzimas proteolíticas como Lisozima para la extracción de ADN.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abuauada MC, Osorio SG, Rojas PML, Lorena-Pino V. 2005.** Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect* 22: 93-97.
2. **Acha PN, Szyfres B. 2003.** Leptospirosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I Bacteriosis y Micosis, 3ª ed. Publicación Científica y Técnica No. 580. Organización Panamericana de la Salud. Washington, EUA. p. 175-186.
3. **Adler B, De la Peña Moctezuma A. 2010.** *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 140: 287-297.
4. **Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. 2012.** Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis.* 54:1249–55.
5. **Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. 2009.** Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 4(9): e7093.
6. **Abgueguen P, Delbos V, Blanvillain J, Chennebault JM, Cottin J, Fanello S. 2008.** Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J Infect*; 57: 171-178.
7. **Andre-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen H. 2003.** Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec.* 153: 165.
8. **André - Fontaine, G. 2006.** Canine leptospirosis – do we have a problem? *Vet. Microbiol.* 117: 19 – 24.

9. **Arce JY, Ribeyro RE. 1917.** Sobre un caso de espiroquetosis icterohemorrágica. *Cron Med (Lima)*; 34: 355-60.
10. **Asuthkar S, Velineni S, Stadlmann J, Altmann F, Sritharan M. 2007.** Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 75(9): 4582-4591.
11. **Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL. 2010.** Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: 375–87.
12. **Ayanegui MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins JM, Heuer C, Midwinter AC. 2007.** Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. *NZ Vet. J.* 55(Nº3): 102-108.
13. **Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA. 2003.** Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 41: 803–809.
14. **Bal A, Gravekamp C, Hartskeerl R, De Meza J, Korver H, Terpstra W. 1994.** Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32(8): 1894-1898.
15. **Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KI, Tiley LW. 2002.** Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. *Infect Immun* 70: 6926-6932.
16. **Barr SC, Mc Donough PL, Scipioni-Ball RL. 2005.** Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. *Am J Vet Res* 66 (10): 1780-1784
17. **Bernard W. 1993.** Leptospirosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract* 9: 435-444
18. **Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J. 2003.** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3(12): 757-771.
19. **Blum S, Chi M, Maldonado M, Nuñez L, Gómez M, Caballero R, Tamay P. 2013.** Detection of reactive canines to *Leptospira* in Campeche City, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología* 45: 34-38.
20. **Bomfim M, Koury C. 2006.** Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microbiol* 118: 278-288.
21. **Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D. 2011.** Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infect Dis* 11: 338-346.

22. **Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. 2011.** Comparison of real time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol* 49: 2154–2160.
23. **Brett DM, Lipnick RJ. 2009.** Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3: 42.
24. **Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS, 1999.** Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 49: 839–858.
25. **Brooks G, Carrol K, Butel J, Morse S, Mietzner, T. 2010.** *Microbiología Médica Lange*. 25^a ed. México. McGraw-Hill Interamericana Editores. 815 p.
26. **Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN. 1995.** Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 43: 110-114.
27. **Bulach D, Zuerner R, Wilson P, Seemann T, Mcgrath A, Cullen P. 2006.** Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceed Nat Acad Sciences* 103: 14560-14565.
28. **Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpiboon R. 2008.** Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 46: 254-260.
29. **Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. 2007.** Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 75(5): 2441-2450.
30. **Cerqueira G, Picardeau, M. 2009.** A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 760–768.
31. **Cerqueira GM, McBride AJ, Hartskeerl RA, Ahmed N, Dellagostin OA, Eslabão MR. 2010.** Bioinformatics describes novel Loci for high-resolution discrimination of leptospira isolates. *PLoS One* 5 (10): e15335.
32. **Céspedes M, Fernández R, Rimarachin R, Taipe H, Cenepo J, Mori y Gonzales M. 2004.** Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 21(2): 62-70.
33. **Céspedes M, Chun M, Cano E, Huaranca I, Atoche H, Ortiz H, et al. 2007.** Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en personas asintomáticas y en perros de Chancay, Lima 2001. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 24(4): 343-349.
34. **Céspedes M. 2005.** Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 22(Nº4): 290-307.

35. **Céspedes M, Balda L, Gonzales D, Tapia R. 2006.** Situación de la leptospirosis en el Perú 1994 -2004. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 23(1): 52-62.
36. **Cinco M. 2010.** New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of the host defences. *New Microbiologic* 33: 283-292.
37. **Cinco M, Domenis R, Perticarari S, Presani G, Marangoni A, Blasi E. 2006.** Interaction of leptospire with murine microglial cells. *New Microbiol* 29(3): 193-199.
38. **Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. 1973.** Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 25(6): 976-980.
39. **Colleen L, Lee S, Philip W. 2010.** Leptospirosis: An emerging disease in travellers. *Travel Med Infect Dis* 20: 1-7.
40. **Croda J, Figueira C, Wunder E, Santos C, Reis M, Ko AI. 2008.** Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira*: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 76: 5826-5833.
41. **Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. 2009.** Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis*; 19(Suppl 1): 37-41.
42. **Cullen PA, Haake DA, Adler B. 2004.** Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 291–318.
43. **Cumberland P, Everard CO, Levett PN. 1999.** Assessment of the efficacy of an IgM Elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 61: 731-734.
44. **De la Peña Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. 1999.** Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 319-326.
45. **Doungchawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inwisai T, Sagarasaerane P, Haake DA. 2008.** Early diagnosis of leptospirosis by IgM immunoblot testing. *Clin Vaccine Immunol* 15: 492-498.
46. **Effler P, A Bogard, H Domen, A Katz, H Higa, D Sasaki. 2002.** Evaluation of eight rapid screening test for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 40: 1464-1469.
47. **Ellis W, McParland P, Bryson D, Thiermann A, Montgomery J. 1986 .** Isolation of leptospire from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet Rec* 118: 294-295.
48. **Ellis T, Imrie A, Katz A, Effler P. 2008.** Under recognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(4): 541-547.
49. **Erosa-Barbachano G. 2001.** Leptospirosis. *Rev Biomed* 12: 282-287.

50. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. 2006.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19: 165-256.
51. **Faber N, Crawford. 2000.** Deteccion of *Leptospira* spp. In the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol* 38: 2731-2733.
52. **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999.** *Leptospira and Leptospirosis*. 2^a ed. Melbourne. MediSci. p 138-140.
53. **Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C and Woodward MJ 2008.** The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res Vet Sci* 85: 8-16.
54. **Fonseca D, Gutiérrez A, Mateus H, Silva C, Contreras N, Giraldo A. 2005.** Análisis de muestras de orina para la detección molecular de enfermedades infecciosas. Aplicación en la identificación de citomegalovirus humano. *Revista Ciencias de la Salud* 3(2): 136-147.
55. **García R, Reyes A, Hernández D, Ramírez M, Rivas B. 2013.** Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev. Latinoamericana Clínica* 60 (1): 57-70.
56. **Galloway RL, Levett PN. 2010.** Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e824.
57. **Goldstein RE. 2006.** Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 20: 489-494.
58. **Goris MGA, Leeflang MMG, Boer KR, Goeijenbier M, van Gorp ECM, Wagenaar JFP. 2012.** Establishment of valid laboratory case definition for human leptospirosis. *J Bacteriol Parasitol* 3: 132-140.
59. **Greene C, Sykes J, Brown C, Hartmann K. 2008.** Leptospirosis. En: Greene C. 2008. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. 3^a ed. Argentina: Intermédica. p 302-310.
60. **Greene, C., Sykes J., Moore G., Goldstein E., Schultz D. 2012.** Leptospirosis. En: Greene C. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th. USA: Elsevier p 431-446.
61. **Grooms D. 2006.** Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenol* 66: 624-628.
62. **Gsell O, Mohr W. 1968.** *Infektionskrankheiten*. Berlin: Springer-Verlag KG. 845 p.
63. **Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray S, Kaczmarski E, Howells D, Boseley P, Fox J. 2000.** Evaluation of the Applied Biosystems automated TaqMan polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Microbiology Letters* 28: 173- 179.
64. **Haake DA, Martinich C, Summers TA. 1998.** Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: down regulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infection and Immunity* 66 (4): 1579-1587.

65. **Hartskeel RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2001.** Emergence, control and reemerging leptospirosis; dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501.
66. **Hartskeel RA. 2005.** International Leptospirosis Society. Objectives and achievements. *Rev Cub Med Trop* 57: 7-10.
67. **Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. 2008.** LipL32 is an extracellular matrix interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun* 76(5): 2063-2069.
68. **Hung CC, Chang CT, Tian YC, Wu MS, Yu CC, Pan MJ. 2006.** Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll – like receptor 2 and p38 mitogen activa-ted protein kinase. *NDT* 21: 898-910.
69. **International Committee on Systematics of Prokaryotes. 2008.** Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1049-1050.
70. **Jiménez M, Vado I, Cárdenas MF, Rodríguez JC, Ortega A. 2008.** Serological Survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. *Acta Trop* 106: 22-26.
71. **Johnson DW. 1950.** The Australian leptospiroses. *Med J Aust* 2: 724-731.
72. **Johnson RC, Rogers FC. 1964.** Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *J Bacteriol* 88: 1618-1623.
73. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009.** *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736-747.
74. **Laguna V. 2000.** Leptospirosis. Módulos Técnicos. (Oficina General de Epidemiología / Instituto Nacional de Salud). Serie Documentos Monográficos. No. 2, Lima. 56 p.
75. **Levett PN. 2001.** Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 296-326.
76. **Levett PN. 2004.** Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin Microbiol Rev* 4: 435-448.
77. **Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. 2005.** Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45-49.
78. **Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. 2006.** *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 671-673.
79. **Levett PN, Haake DA. 2009.** *Leptospira* species (leptospirosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. p 241-247.
80. **Liceras de Hidalgo J, Hidalgo R. 1970.** Leptospirosis in cattle and slaughtermen of Tumbes, Perú. *Bol Oficina Sanit Panam.* 68(4): 297-306.

81. **Lilenbaum W, Varges R, Brandão F, Cortez A, De Souza S, Brandão P, Richtzenhain L, Vasconcellos S. 2008.** Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 69 (7): 837-842.
82. **Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza S, Richtzenhain L, Vasconcellos S. 2009.** Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 87(1): 16-19
83. **Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, Chierakul W. 2012.** Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a re-evaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clin Infect Dis* 55: 322-331.
84. **Lisby G, Dessau RB, Andersen CB, Ladefoged S. 1994.** Polymerase chain reaction as a rapid diagnostic assay for Cytomegalovirus infection in renal transplant patients. *APMIS* 102: 690-694.
85. **Louvel H, Picardeau M. 2007.** Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. *Curr Protoc Microbiol* 12: 12-14.
86. **Madrid F. 1974.** Estudio serológico de leptospirosis en personal militar y equinos de Querocotillo (Departamento de Piura). Tesis de bachiller. Lima: Facultad de Biología, Universidad Particular Ricardo Palma.
87. **Malajov Y, Panin A, Sovolova G. 2007.** Leptospirosis de los animales. 3ª ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. p 24-53.
88. **Magajevski F, Silva R, Mathias L, Myashiro, Genovez M, Scarcelli E. 2005.** Detection of *Leptospira* spp. In the semen and urine of bulls serologically reactive to leptospira interrogans serovar hardjo. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 43-47.
89. **Manual Biotoools. 2008.** Kit para la Extracción y Purificación de ADN Genómico a partir de tejidos, células, bacterias, hongos y fluidos orgánicos. BIOTOOLS B&M Labs. Madrid. España. 18 p.
90. **Markey B, Leonard F, Archambault, M, Cullinane A, Maguire D. 2013.** *Clinical Veterinary Microbiology*. 2ª Ed. USA: Elsevier 901 p.
91. **Marotto P, Ko A, Murta C, Seguro F, Prado R, Barbosa M. 2010.** Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *J Infec* 60: 218-223.
92. **Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TY, Sánchez Y, Siqueira I. 2003.** Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49: 929-945.
93. **Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. 2008.** Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique leptospira

- associated with a rattus species reservoir in the peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2: e213.
94. **McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. 2005.** Leptospirosis. Curr. Opin. Infect Dis 18: 376-386.
 95. **Méendes V, Simoes M, Barbosa A, Navegantes W. 2011.** Years of potencial life losto and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. Rev Saúde Pública 45(6): 01-07.
 96. **Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In clinical samples. J Clin Microbiol 30: 2219 - 2224.
 97. **Mérien F, Baranton G, Perolat P. 1997.** Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. Infection and Immunity 65 (2), 729–738.
 98. **Mérien, F., Truccolo, J., Rougier, Y., 1998.** In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. FEMS Microbiology Letters 169 (1), 95–102.
 99. **Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. 2005.** A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett 249: 139–147.
 100. **Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM. 2011.** Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. J Vet Intern Med 26: 149-152.
 101. **Monahan AM, Miller IS, Nally JE. 2009.** *Leptospirosis: risks during recreational activities.* J Appl Microbiol; 107(3): 707-716.
 102. **Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. 2006.** *Species specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing .* J Clin Microbiol 44: 3510-3516 .
 103. **Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC. 2002.** *Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois.* Clin Infect Dis 34(12): 1593-1599.
 104. **Murray G, Ellis K, Lo M, Adler B. 2008.** *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. Microb Infect 10: 791-797
 105. **Murray G, Srikram A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan R, Adler B. 2009.** *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. Microb Infect 11: 311-314.
 106. **Musso D, La Scola B. 2013.** *Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge.* Journal of Microbiology, Immunology and Infection 46: 245-252.

107. **Najera S, N Alvis, D Babilonia, L Alvarez, S Mattar. 2005.** *Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. Salud pública de México* 47: 240-244.
108. **Nally J, Chow E, Fishbein M, Blanco D, Lovett M. 2005.** *Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguishes acute versus chronic Leptospira interrogans infections. Infect Immun* 73(6): 3251-3260.
109. **Nascimento L, Ko A, Martins A, Monteiro-Vitorello C, Ho PL, Haake DA. 2004.** *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveal novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol* 186: 2164-2172.
110. **Navarrete J, Acevedo J, Huerta E, Torres J, Gavaldón D. 2006.** *Prevalencia de anticuerpos contra dengue y Leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. Sal Pub Mex* 48: 220-228.
111. **Nelson R, Couto G. 2010.** *Medicina Interna de Pequeños Animales. 4a ed. España: Elsevier. 2860 p.*
112. **[OIE] World Organization For Animal Health. 2014.** *Leptospirosis. OIE Terrestrial Manual 2014. 15 p.*
113. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2008.** *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. (Serie de Manuales Técnicos, 12), Brasil.p.127.*
114. **Ooteman M, Vago A, Koury M. 2006.** *Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. J Microbiol Methods* 65: 247-257.
115. **Pachas P, Cjuno R, Portugal M, Taboada B, Felices V, Laguna- Torres A. 2001.** *Seroprevalencia de leptospirosis en humanos y reservorios en la localidad de Koribeni, La Convención, Cusco. Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales* 1(2): 87-91.
116. **Palaniappan R, Chang Y, Chang C, Pan M, Yang C, Harpending P, McDonough S, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. 2005.** *Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol. Cell. Probes* 19: 111–117.
117. **Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. 2007.** *Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. Curr Opin Infect Dis* 20(3): 284-292.
118. **Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. 2008.** *The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int J Infect Dis* 12(4): 351-357.
119. **Perez J, Goarant C. 2010.** *Rapid Leptospira identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol* 10: 325-336.

120. **Perolat P, Lecuyer I, Postic D, Baranton G. 1993.** Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. *Res. Microbiol* 144: 5-15.
121. **Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. 2001.** First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology* 40: 189-199.
122. **Picardeau M, Bulach D, Bouchier C, Zuerner R, Zidane N, Wilson P. 2008.** Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3: 1599-1607.
123. **Picardeau M. 2013.** Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43 (1): 1-9.
124. **Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. 2005.** *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. España: Acribia. 1200 p.
125. **Quinn P, B. Markey, M. Carter, W. Donnelly y F. Leonard. 2011.** *Veterinary Microbiology and microbial disease*. 2a ed. U.S.A. : Blackwell Science Ltd. 1231 p.
126. **Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD. 2008.** Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4): 228.
127. **Ren S, Fu G, Jiang X, Zeng R, Miao Y, Xu H, Zhang Y, Xiong H, Lu G, Lu L, Jiang H, Jia J, Tu Y, Jiang J, Gu W, Zhang Y, Cai Z, Sheng H, Yin H, Zhang Y, Zhu G, Wan M, Huang H, Qian Z, Wang S, Ma W, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Xia Q, Guo X, Danchin A, Saint I, Somerville R, Wen Y, Shi M, Chen Z, Xu J, Zhao G. 2003.** Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422(6934): 888-893.
128. **Richtzenhain L, Cortez A, Heinemann M, Soares R, Sakamoto S. 2002.** A multiplex PCR for the detection of *Brucella* sp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol* 87: 139-147.
129. **Ristow P, Bourhy P, McBride F, Figueira C, Huerre M, Ave P. 2007.** The OmpA-Like protein *Loa22* is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathogens* 3: 90-97.
130. **Rocha F, Spichler A, Athanazio D. 2010.** Leptospirosis associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica*. 115: 155-162.
131. **Roczek A, Forster C, Raschel H, Hormansdorfer S, Bogner KH, Hafner-Marx A, Lepper H, Dobler G, Buttner M, Sing A, 2008.** Severe course of rat bite associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. *J. Med Microbiol* 57: 658-663.
132. **Rodríguez A, Ferro B, Varona M, Santafé M. 2004.** Evidencia de exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. *Biomédica* 24: 291-295.

133. **Rodríguez I, Rodríguez JE, Fernández C. 2005.** Alcalinización de la orina humana para el aislamiento experimental de *Leptospiras*. *Rev Cubana Med Trop* 57: 55-56.
134. **Rodríguez H, Lozano C, Bedoya C, Grondona L. 2009.** Prevalencia de leptospirosis en humanos en la zona urbana del municipio de Puerto Libertador, Córdoba, Colombia *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 0 (1): 23-28.
135. **Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller I, Markey B, Nally J. 2010.** Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 1305–1309.
136. **Romero M, Sanchez V. 2009.** Seroprevalencia de Leptospirosis canina de tres municipios del departamento del Tolima-Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 14(2): 1684-1689.
137. **Romero M, Sánchez J, Hayek L. 2010.** Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. *Rev. Salud pública.* 12 (2): 268-275.
138. **Sambsiava R, Naveen G, Agarwal SK. 2003.** Leptospirosis in India and the rest of the world. *Braz J Infect Dis* 7(3): 178-193.
139. **Sasaki DM, Pang L, Minette HP, Wakida CK, Fujimoto WJ, Manea SJ, 1993.** Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* 48(1): 35-43.
140. **Schreiber P, Martin V, Nabjar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. 2005.** Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol* 108: 113.
141. **Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H. 2005.** Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 40: 343–351.
142. **Sehgal SC. 2006.** Epidemiological patterns of leptospirosis. *Indian J Med Microbiol* 24(4): 310-311.
143. **Serrano M. 2012.** Exposición a *Leptospira* spp patógena del elefante marino, *Mirounga angustirostris*. Tesis Maestra en ciencias en ecología molecular y biotecnología. México: Universidad Autónoma de Baja California. 134 p.
144. **Silva MV, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Brandão AP, Nakamura PM. 1995.** Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J Trop Med Hyg.* 98: 268-72.
145. **Silva R, Riedemann S. 2007.** Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch Med Vet* 39(3): 269-274.

146. **Silva E, Santo C, Athanzio D, Seyffert N, Seixas F, Cerqueira GM. 2008.** Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in hamster model. *Vaccine* 26: 3892-3896.
147. **Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. 2006.** Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 6: 95.
148. **Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. 2007.** Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira* specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 361-366.
149. **Slack AT, Kalambaheti T, Symonds M, Dohnt M, Galloway R, Steigerwalt A, Chaicumpa W, Bunyaraksyotin G, Craig S, Harrower B, Smythe L. 2008.** *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2305-2308.
150. **Slack A, Khairani-Bejo S, Symonds M, Dohnt M, Galloway R, Steigerwalt A, Bahaman A, Craig S, Harrower B, Smythe L. 2009.** *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 705-708.
151. **Smythe L, Smith I, Smith G., Dohnt M, Symonds M, Barnett L, McKay D. 2002.** A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* 2: 13-20.
152. **Stoddard R, Gee J, Wilkins P, McCaustland K, Hoffmaster A. 2009.** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247-255.
153. **Sykes J, Hartmann K, Lunn K, Moore G. 2011.** ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 25: 1-13.
154. **Tam M. 2003.** Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing inhibitors. *J Clin Microbiol* 41: 778-782.
155. **Tepstra W, Hartskeerl R, Smits H, Korver H. 2006.** International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute, Amsterdam. p.1-124.
156. **Sykes JE. 2014.** *Canine and feline infectious diseases.* USA: Elsevier Saunders. 915 p.
157. **Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S. 2011.** Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One* 6: e16236.

158. **Torales, M. 2002.** Leptospirosis. *Carta Infectológica* 2: 3-6
159. **Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P. 2011.** Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol Lett* 204: 317–321.
160. **Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cukken O, Haake D. 2004.** Cell aggregation a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35-40.
161. **Vargas E. 2014.** Situación de la leptospirosis en el Perú, años 2013-2014 (a la SE 19). *Boletín Epidemiológico (Lima)* 23 (19): 382-385.
162. **Verkooyen R, Luijendijk W, Huisman W, Goessesns J. 1996.** Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the amplicor *Chlamydia trachomatis* assay. *J Clin Microbiol* 34: 3072-3074.
163. **Vijayachari P, Sugunan AP, Umapathi T, Sehgal SC. 2001.** Evaluation of dark ground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res* 114: 54-58.
164. **Vijayachari P, Sehgal SC. 2006.** Advance in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterization of leptospirosis. *Indian J Med Microbiol* 24(4): 320-322.
165. **Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. 2008.** Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 33(4): 557-569.
166. **Villumsen S, Pedersen R, Krogfelt K, Jensen J. 2010.** Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: improved method for DNA extraction from blood cultures. *PLoS One* 5: e12095.
167. **Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. 2012.** Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pitfalls of in silico validation. *J Microbiol Methods* 91: 184-90.
168. **Wagenaar J, Zuerner RL, Alt D, Bolin CA. 2000.** Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am J Vet Res* 61: 316-320.
169. **Walker NJ. 2002.** Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
170. **Wang C, Freeman M, Kaltenboeck B. 2012.** *Veterinary PCR diagnostics.* Bentham Ebooks. U.S.A. 137 p.
171. **Ward MP. 2002.** Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada. *Prevent Vet Med* 56: 215-226.
172. **Ward MP. 2002.** Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc* 220: 53.

173. **[WHO] World Health Organization. 1999.** *Leptospirosis worldwide. Wkly Epidemiol Rec* 74: 237-242.
174. **[WHO] World Health Organization International, Leptospirosis Society [ILS]. 2003.** *Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.* Malta: WHO, ILS. 109 P.
175. **Xue F, Yan J, Picardeau M. 2009.** *Evolution and pathogenesis of Leptospira spp.: lessons learned from the genomes. Microb Infect* 11: 328-333.
176. **Yang C, Hung C, Wu M, Tian Y, Chang C. 2006.** *Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. Kidney International* 69: 815-822.
177. **Yasuda P, Steigerwalt A, Sulzer K, Kaufmann A, Rogers F, Brenner D. 1987.** *Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species. Int J Syst Bacteriol* 37: 407-415.
178. **Zúñiga C, Baeza B, Bernal A, Muñoz W, Domínguez M. 2011.** *Casos de leptospirosis posterior a la gran inundación en el Municipio de Centro, Estado de Tabasco, 2007. Enf Inf Microbiol* 31 (1): 33-37.

VIII. APÉNDICE

Anexo A1. Protocolo de extracción de ADN de *Leptospira* spp de cultivos bacterianos en EMJH.

A. Preparación de las muestras

1. Sembrar 500 µl de cultivo fresco de cada uno de los serovares de *Leptospira* spp. en 5 ml de medio EMJH.
2. Evaluar los cultivos de *Leptospira*, asegurarse de que sean cultivos jóvenes con un crecimiento de 5 (en la escala de 1 a 7)
3. Transferir cada cultivo a tubos más pequeños para centrifugarlo a 4400 rpm por 25 minutos. Al trasvasar el cultivo asegurarse de no coger el fondo.
4. Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado (con pipeta)
5. Homogenizar y transferir el pellet por decantación a un ependorf de 1,5 ml, completar con PBS 1X hasta tener 1 ml de muestra en cada ependorf. Homogenizar.
6. Centrifugar a 16 000 g por 20 minutos a 4 °C.
7. Eliminar el sobrenadante (por decantación)
8. Resuspender el sedimento en 1 ml de PBS 1X para lavar las células. Homogenizar
9. Centrifugar a 16 000 g por 10 minutos a 4 °C.
10. Eliminar el sobrenadante (por decantación)
11. Agregar 100 µl de lisozima 50mg/ml e incubar a 37°C por 60 minutos.

B. Extracción de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega)

1. Centrifugar a 16 000 g durante 4 minutos, eliminar el sobrenadante.
2. Agregar 600 µl de solución de lisis nuclear y mezclar por pipeteo.
3. Incubar a 80 °C durante 5 minutos y luego enfriar a temperatura ambiente
4. Agregar 4 µl de solución ARN asa y mezclar (invertir el tubo 3 veces)
5. Incubar durante 30 minutos a 37°C y enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 µl de solución proteica de precipitación, homogenizar y enfriar hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar 16 000 g durante 4 minutos.

8. Transferir el sobrenadante a un tubo fresco contenido 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
9. Mezclar por inversión
10. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclar.
12. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos
13. Aspirar el etanol y secar el pellet con aire seco durante 15 minutos.
14. Rehidratar el ADN en 100 µl de solución de rehidratación de ADN durante 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.
15. Guardar en congelación a -80°C o a -20°C.

Anexo A2. Protocolo de extracción de ADN de *Leptospira* spp de muestras de orina infectadas experimentalmente.

A. Preparación de las muestras

1. Centrifugar las orinas infectadas a 16000 g por 20 minutos a 4 °C.
2. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de PBS 1X. Homogenizar
3. Centrifugar a 16 000 g por 10 minutos a 4 °C y eliminamos el sobrenadante por decantación
4. Agregar 100 µl de lisozima 50mg/ml e incubar a 37°C por 60 minutos.

B. Extracción de ADN (Wizard® Genomic DNA Purifaciton Kit – Promega)

1. Centrifugar a 16 000 g durante 4 minutos, eliminar el sobrenadante.
2. Agregar 600 µl de solución de lisis nuclear y mezclar por pipeteo.
3. Incubar a 80 °C durante 5 minutos y luego enfriar a temperatura ambiente
4. Agregar 4 µl de solución ARN asa y mezclar (invertir el tubo 3 veces)
5. Incubar durante 30 minutos a 37°C y enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 µl de solución proteica de precipitación, homogenizar y enfriar hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar 16 000 g durante 4 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo fresco contenido 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
9. Mezclar por inversión
10. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclar.
12. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos
13. Aspirar el etanol y secar el pellet con aire seco durante 15 minutos.
14. Rehidratar el ADN en 100 µl de solución de rehidratación de ADN durante 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.
15. Guardar en congelación a -80°C o a -20°C.

Anexo A3. Protocolo de extracción de ADN de otros géneros bacterianos

1. Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante. Para bacterias Gram positivas, continúe con el paso 3, **para las bacterias Gram negativas ir directamente al paso 7.**
3. Resuspender las células a fondo en 480 µl de 50 mM EDTA.
4. Agregar 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml).
5. Incubar a 55 °C durante una hora en agitación continua. Luego desactivar la proteinasa k con calor a 94 °C durante 10 minutos y enfriar a 4 °C.
6. Centrifugar a 16000 g durante 4 minutos, eliminar el sobrenadante.
7. Agregar 600 µl de solución de lisis nuclear y mezclar por pipeteo.
8. Incubar a 80 °C durante 5 minutos y luego enfriar a temperatura ambiente
9. Agregar 4 µl de solución ARN asa y mezclar (invertir el tubo 3 veces)
10. Incubar durante 30 minutos a 37°C y enfriar a temperatura ambiente.
11. Agregar 200 µl de solución proteica de precipitación, homogenizar y enfriar hielo durante 5 minutos.
12. Centrifugar 16 000 g durante 4 minutos.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo fresco contenido 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
14. Mezclar por inversión
15. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos.
16. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclar.
17. Centrifugar a 16 000 g durante 3 minutos
18. Aspirar el etanol y secar el pellet con aire seco durante 15 minutos.
19. Rehidratar el ADN en 100 µl de solución de rehidratación de ADN durante 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.
20. **Guardar en congelación a -80°C o a -20°C.**