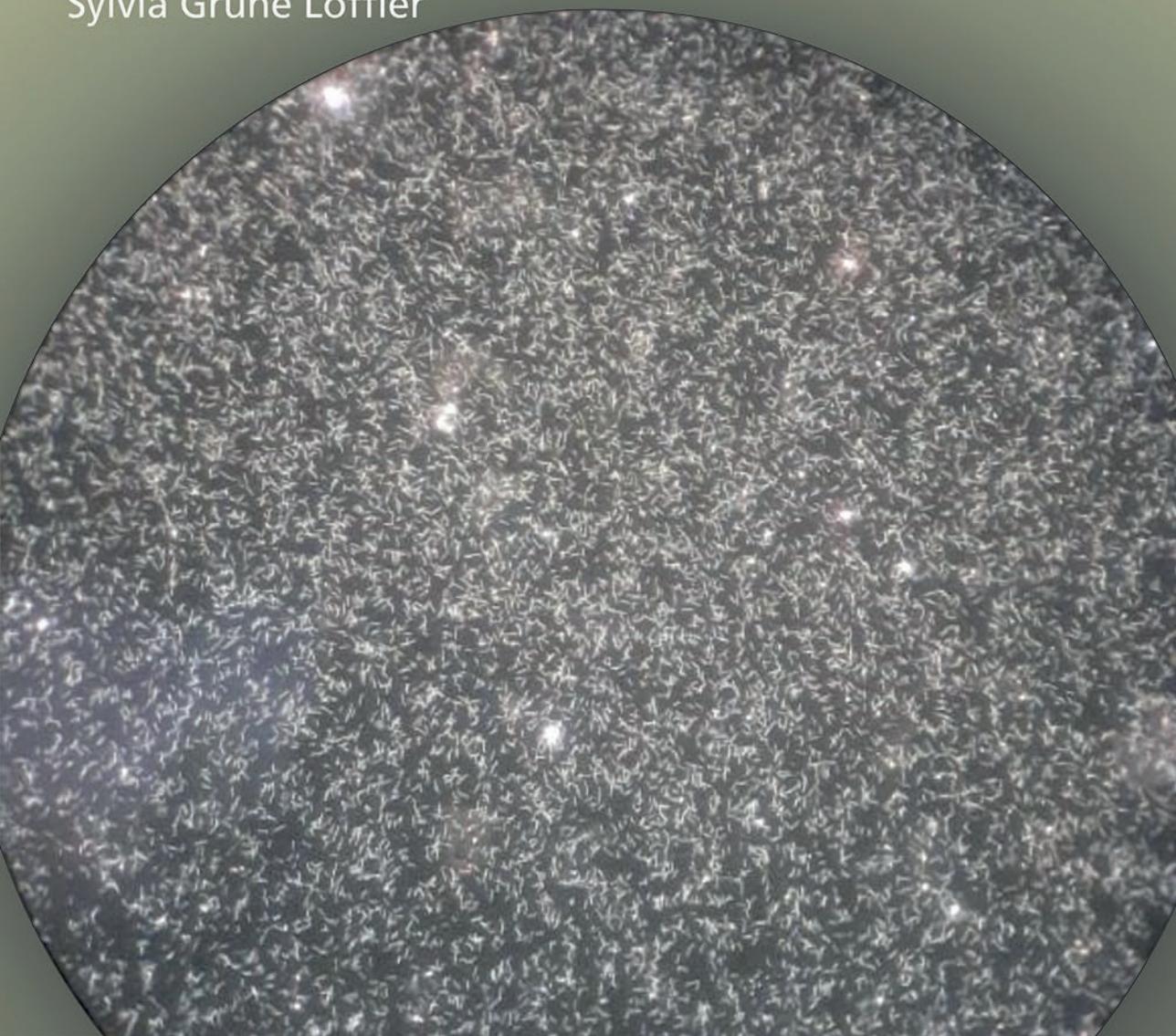


Manual sobre diagnóstico molecular de leptospirosis

Sylvia Grune Loffler



INTA Ediciones

Colección
RECURSOS

Manual sobre diagnóstico molecular de leptospirosis

Sylvia Grune Loffler



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

INTA Ediciones
Instituto de Patobiología - IPVET- CICVyA
2022

591.2 Grune Löffler, Sylvia
G92 Manual sobre diagnóstico molecular de leptospirosis / Sylvia Grune Löffler.
– Buenos Aires : Ediciones INTA, Instituto de Patobiología - IPVET-
CICVyA, 2022.
101 p. : il. (en PDF)

ISBN 978-987-679-325-4 (digital)

i. título

LEPTOSPIROSIS – DIAGNOSTICO – ZOONOSIS – GENETICA

DD-INTA

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899.

Diseño:
Área de Comunicación Visual
Gerencia de Comunicación Institucional

Este libro
cuenta con licencia:



Contenidos

Prólogo	5
----------------	----------

Capítulo I Introducción	7
--------------------------------	----------

Generalidades sobre las zoonosis	8
----------------------------------	---

Importancia de la leptospirosis	11
---------------------------------	----

El agente etiológico	16
----------------------	----

Taxonomía y nomenclatura	19
--------------------------	----

Epidemiología	20
---------------	----

Capítulo II Caracterización molecular de leptospiras patógenas	24
---	-----------

Múltiple-Locus Variable-number tandem repeat Análisis (MLVA)	29
--	----

Protocolos de extracción y purificación de ADN	31
--	----

Revelado de amplificaciones y análisis de geles	33
---	----

Construcción de árboles filogenéticos	35
---------------------------------------	----

Secuenciación de cepas con genotipo sin determinar mediante MLVA	38
--	----

Secuencias procesadas	39
-----------------------	----

Análisis de coordenadas principales (PCoA)	40
--	----

Interpretación de los resultados obtenidos por el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	42
--	----

Capítulo III Aplicaciones del diagnóstico molecular	44
Capítulo IV Estudios genómicos	50
Capítulo V Detección molecular de leptospiras en el medioambiente	63
Capítulo VI Protocolos de PCR	66
Procedimientos pre-PCR	68
Procedimientos post-PCR	78
Consideraciones finales	80
Bibliografía	80
Anexos	96

Prólogo

Este manual es una recopilación sobre las herramientas moleculares de diagnóstico y caracterización de cepas aisladas. Este trabajo es resultado de la integración de más de 10 años de trabajo durante mi tesis doctoral y posdoctorado en esta temática. Todo el trabajo fue realizado en el Laboratorio de Leptospirosis, Laboratorio de referencia de la OIE (referato compartido con SENASA), ubicado en el Instituto de Patobiología-IPVET perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA. Este laboratorio es pionero en la investigación de leptospirosis animal y es por ello que recibió una placa homenajeando los diversos estudios por el grupo creado y dirigido por el Dr. Roberto Cacchione. En la actualidad el grupo de investigación está conformado por dos investigadoras más (Dra. Bibiana Brihuega y Dra. Mara Martínez) y actualmente tres becarias doctorales (Lic. Vanina Saraullo, Bioq. Micaela Hamer y Vet. Olivia Watanabe). Este manual brinda en detalle los protocolos aplicados al diagnóstico molecular y caracterización del género *Leptospira* spp., en especial al grupo de las cepas pertenecientes a las especies patógenas. Los anexos presentados en este manual brindan información adicional a este, representando el fruto de los años trabajados y sirve para profundizar la aplicación de las herramientas descriptas en este trabajo. A pesar de que esta zoonosis no se encuentra en la agenda actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) persiste la necesidad de seguir profundizando el estudio de esta enfermedad en un contexto de la interfase animal-humano-ambiente, poniendo en valor los antecedentes de estudios a nivel nacional e internacional y así poder seguir investigando esta zoonosis y brindar soluciones a la población. Actualmente, vivimos en un contexto socioeconómico vulnerable y en un ambiente cambiante que se manifiesta frecuentemente. Este manual pretende ofrecer una lectura dinámica a través de capítulos que pueden ser consultados de manera independiente, pero se relacionan entre sí incentivando a una lectura completa. La revisión bibliográfica presentada en los capítulos es producto de la lectura crítica enfocada a la practicidad de los estudios moleculares sobre el género *Leptospira* spp. Durante los años de formación sobre esta temática, el dictado de cursos y la capacitación

profesional de colegas de un abanico de profesiones (veterinarios, médicos, técnicos de laboratorio, bioquímicos, biólogos y ecólogos), tomé la iniciativa de redactar este manual, el cual puede ser consultado a lo largo de los años venideros como una guía básica de diagnóstico molecular a pesar del flujo intenso de estudios publicados año a año sobre el estudio molecular de leptospirosis. Este manual está dirigido a estudiantes y profesionales jóvenes que quieran incursionar en la investigación de este agente zoonótico, de importancia mundial y endémico en muchos países. La intención de este manual es incentivar en aplicar conceptos novedosos a problemáticas actuales e innovar en la respuesta de soluciones para la población, desarrollando herramientas diagnósticas veraces, fáciles de interpretar y de resultado rápido.

Este trabajo no pudo ser posible sin la ayuda del grupo de investigación perteneciente al Instituto de Patobiología-IPVET INTA Castelar y con el apoyo íntegro de INTA y del CONICET para el desarrollo de mi tesis doctoral y trabajo de posdoctorado. Amerita dar un especial agradecimiento a mis mentores que me han guiado y formado desde mis inicios como estudiante de biología, hasta convertirme en investigadora del CONICET. Al Prof. Juan Carlos Capelo (director de EDIMAR-FLASA), a la Dra. Bibiana Brihuega (directora del Instituto de Patobiología -IPVET (referente internacional en leptospirosis animal, ILS, y directora de mi tesis doctoral) y al Dr. Luis Samartino (referente de la OIE). También quiero aprovechar en hacer especial mención a los técnicos Graciela Romero y Carmelo Auteri, que durante su prolongada estancia en el laboratorio de leptospirosis han aportado mucho para el crecimiento y mantenimiento de las actividades de este grupo de trabajo. Los otros grupos de investigación que formaron parte como colaboradores en diversos proyectos y siguen siendo parte de este suman un valor importante en la recolección de muestras y publicación de datos. A la Dra. Mónica Jacobsen, por sus valiosos aportes en la redacción de publicaciones y proyectos de investigación como también a Daiana Hollender, Flavia Hasenauer, Sabina Loffler y a mis mentores en la corrección de este manuscrito.



CAPÍTULO I

Introducción



Generalidades sobre las zoonosis

Las zoonosis se definen como enfermedades de animales vertebrados que son transmitidas naturalmente al hombre, de manera directa o indirecta. La transmisión indirecta puede manifestarse a través de la presencia de estos patógenos en el medioambiente o en productos derivados de la producción animal (huevos, leche, carne). De los 1.415 patógenos humanos conocidos en el mundo, el 61 % son zoonóticos y por lo tanto tienen una relación directa con actividades de la Agricultura y la Producción Animal (Organización Mundial de la Salud, 2020). Los recientes brotes de enfermedades emergentes zoonóticas y la agenda inacabada de las zoonosis tienen una multiplicidad de riesgos y afectan principalmente a las poblaciones en condiciones de vida menos favorables.

El 80 % de los agentes patógenos que infectan a animales son considerados multihospederos, pueden pasar de animal en animal, sean estos domésticos o animales silvestres periurbanos. Múltiples factores influyen para que se manifieste el potencial zoonótico de algunos de estos patógenos, sean de origen bacteriano o viral, es decir, un escenario epidemiológico multifactorial que detona el potencial epidémico o incluso pandémico, como fue el caso de varias enfermedades virales de influenza humana en décadas pasadas y en la actualidad, como son: influenza aviar, influenza humana (H1N1), síndrome respiratorio de Oriente Medio (en inglés: Middle East Respiratory Syndrome (MERS)), síndrome respiratorio agudo grave (en inglés: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)), y la actual pandemia ocasionada por el COVID-19. Se consideran como enfermedades zoonóticas indirectas y con efecto pandémico el ZIKA, la fiebre amarilla y la fiebre de Nilo.

Existen algunas enfermedades zoonóticas desatendidas a nivel mundial, las cuales se presentan por brotes epidemiológicos y reciben menos atención internacional que las zoonóticas emergentes, estas son: ántrax, brucelosis, tuberculosis bovina, rabia, cisticercosis, echinococcosis, encefalitis japonesa, leptospirosis, fiebre Q, tripanosomiasis y el virus de la fiebre Lassa. Muchas de estas enfermedades son diseminadas a través de los animales domésticos, sin embargo, varias se manifiestan por la conexión con animales silvestres (reservorios)

(brucelosis, leptospirosis, rabia (murciélagos) y echinococcosis) (UN-Environment transmission programme, 2020).

Por un lado, si bien, la Organización Mundial de la Salud reconoce más de 200 enfermedades zoonóticas, resume las de mayor relevancia en las siguientes: rabia, echinococcosis, cystericercosis/taeniasis, brucelosis e infecciones de origen alimentario por trematodos. (WHO, 2020). Por otro lado, la Organización mundial de Sanidad Animal (OIE) reporta para el año 2020 un total de 117 enfermedades infecciosas e infestaciones parasitarias en animales, incluyendo animales terrestres y acuáticos (OIE, 2020).

El cambio desde comunidades de cazadores a grandes industrias de agrocultivos se ha asociado con la emergencia de enfermedades contagiosas en humanos. Durante el siglo pasado las mejoras en higiene y nutrición como también la implementación de vacunas y antibióticos han disminuido la carga de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la expansión de los asentamientos de poblaciones humanas y rodeos de animales de producción sumado al incremento de las tasas de viajeros y el cambio de patrones de comportamiento de las poblaciones han incrementado los peligros sobre la aparición de enfermedades emergentes y el potencial para la aparición de pandemias locales e incluso globales, como fue el caso de la gripe aviar (Morse y col., 1995; McMichael, 2004; Harper y Armelagos, 2010) y la actual pandemia del COVID-19 ocasionada por el SARS Co-V2.

Muchas zoonosis emergentes provienen de animales silvestres y el riesgo de aparición es más alto en zonas tropicales.

La intensificación y expansión de sistemas de producción hacia ambientes donde habitan animales silvestres ha facilitado el pasaje de patógenos hacia animales de producción y viceversa. Esto ha fortalecido la hipótesis de que los animales de producción son hospederos amplificadores que permiten la evolución de estos patógenos haciéndolos transmisibles a humanos (Childs y col., 2007).

En la Figura 1, se puede observar un diagrama de flujo (Jones y col., 2013) donde se esquematiza la interacción de agentes patógenos en la interfaz de animales silvestres, silvestres peridomésticos, animales de producción y humanos, la cual nunca ha sido estática y todos los sis-

temas biológicos poseen una capacidad inherente para la resistencia y adaptación.

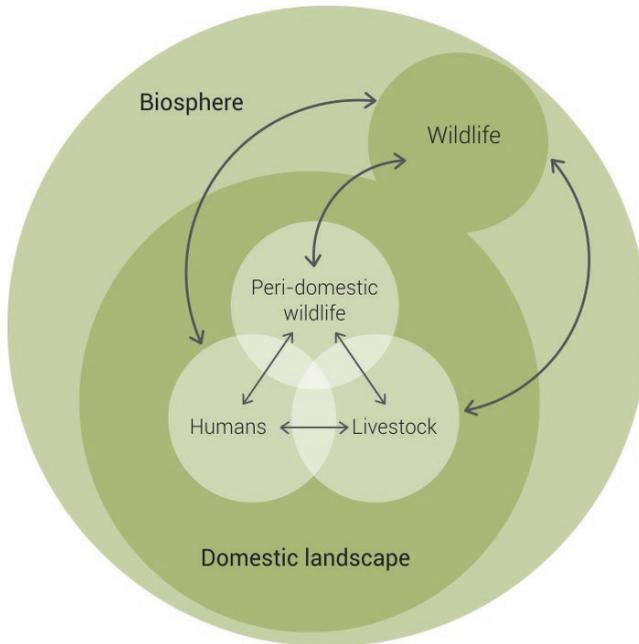


Figura 1. Diagrama de flujo de agentes patógenos en la interfaz de animales silvestres, silvestres peri domésticos, animales de producción y humanos. (Fuente: Jones y col., 2013).

En ecosistemas naturales la coevolución de patógenos y sus hospederos resulta en una selección y adaptación de su patogenicidad. En sistemas intensivos de producción se inclina a favor del agente patógeno incrementándose su capacidad para producir la enfermedad (Jones y col., 2013).

En una revisión bibliográfica sobre fases de una zoonosis, evolución del agente patógeno, transmisión limitada entre humanos, contagio del patógeno entre especies (bovino-humano) y circulación en poblaciones de reservorios, se encontró que la mayoría de los estudios sobre enfermedades zoonóticas se concentran en los patógenos que circulan en poblaciones de reservorios (Lloyd-Smith y col., 2009).

Otro factor no menor es que el uso inadecuado de antibióticos promueve la aparición de resistencia antimicrobiana en patógenos zoonóticos (OMS, 2020).

Importancia de la leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y febril causada por una bacteria perteneciente a las espiroquetas (Orden Spirochaetales Buchanan, 1917) y del género *Leptospira* spp., la cual afecta a animales silvestres y domésticos, actuando estos como fuente de infección para el hombre. El ciclo epidemiológico de esta zoonosis es complejo debido a que participan varias especies, principalmente roedores que actúan como hospederos de mantenimiento (reservorios) de muchas serovariedades en todo el mundo, sin embargo, el hombre y los animales de producción son hospederos accidentales. A nivel mundial la presencia de la enfermedad es mayor en pasíses de clima tropical y subtropical. Esta zoonosis puede ser contagiada por el contacto directo o indirecto con orina contaminada con cepas patógenas de leptospiras.

El esquema del ciclo epidemiológico (Figura 2) representa las posibles fuentes de contagio para el hombre y animales domésticos, a través

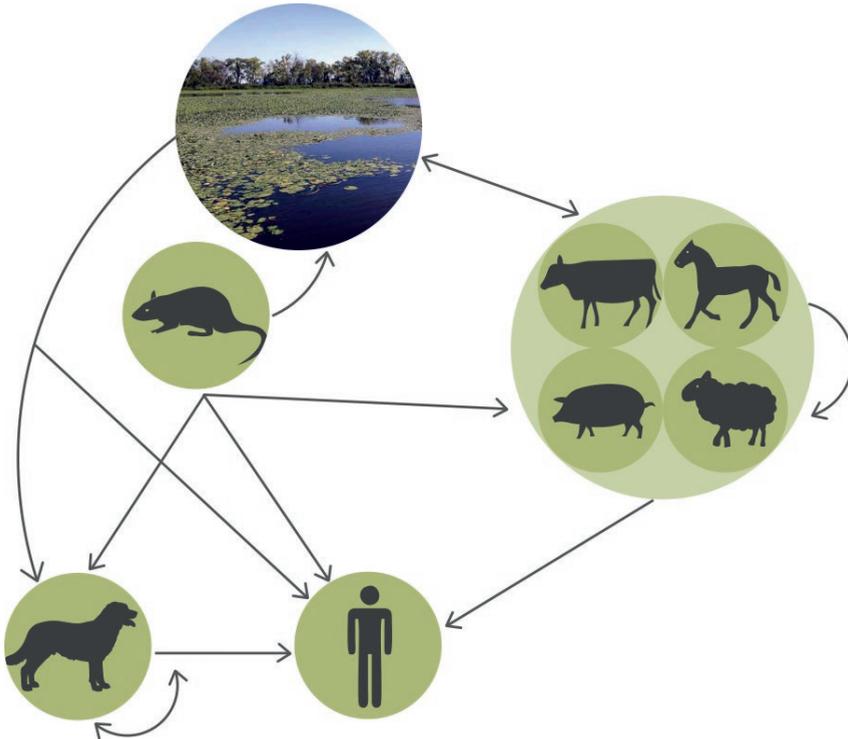


Figura 2. Esquema del ciclo epidemiológico de leptospirosis. (Fuente: Grune, 2014).

del ambiente el contacto puede ser indirecto con bacterias patógenas o intermedias del género *Leptospira* spp., las cuales son diseminadas por animales reservorios, principalmente roedores, a través de su orina. Los animales de producción pueden contagiarse entre la misma población, esto se manifiesta mediante brotes epidemiológicos conocidos como tormentas de abortos o lluvia de abortos, más frecuentes en bovinos. Los caninos pueden contagiarse de manera indirecta y ellos pueden transmitir la enfermedad al humano. Es recomendable vacunar los caninos y los bovinos en campos de producción animal con antecedentes de abortos o con historia de infertilidad.

La República Argentina es un país endémico con brotes epidémicos. En la ganadería la importancia de la leptospirosis radica en las pérdidas que produce en la reproducción donde pueden aparecer natimortos, aborto, nacimientos de animales débiles e infertilidad. Resulta difícil estimar las pérdidas por este concepto, en gran parte por las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad (Ellis, 1994).

El descubrimiento de leptospirosis como agente infeccioso ocurrió hace un poco más de un siglo (1910) en síndromes severos de la enfermedad de Weil en Japón y Europa. Desde ese momento se han aislado en casi todos los continentes en un gran número de especies de mamíferos, excepto en la Antártida, clasificando la leptospirosis en la actualidad como una de las zoonosis con mayor distribución mundial (Adler, 2015).

En Argentina, el estudio de la enfermedad en los animales se inicia en 1926, cuando el Dr. Mazza en la provincia de Salta observa el microorganismo en frotis de órganos de perro; y el primer aislamiento lo realiza Edmee Chiodi en ratas de la ciudad de Buenos Aires, en 1934.

La leptospirosis en Argentina es considerada una enfermedad profesional por ley 24.557 y se encuentra incluida en el listado de enfermedades profesionales por el decreto 658/96. El riesgo ambiental en zonas urbanas se encuentra influenciado por inundaciones frecuentes, viviendas precarias, calles con barro, presencia de zanjas, acumulación de basura, alta densidad de roedores (*Rattus* spp.) y de animales domésticos. Esta enfermedad presenta brotes anuales, a consecuencia de inundaciones; las zonas de mayor riesgo son las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires (Seijo, 2002).

En la provincia de Santa Fe se han reportado tres brotes muy importantes: en el año 2003 se notificaron un total de 1800 casos, de los cuales 495 fueron casos confirmados, pero no se registraron fallecidos. En el año 2007 se registraron un total de 543 casos, de los cuales 125 casos fueron confirmados y 5 pacientes fallecieron. En el año 2010 se notificaron 614 casos, de los cuales 144 fueron casos confirmados de leptospirosis y 15 fallecidos (Seijo, 2002).

Al analizar los datos estadísticos del país a partir de la información publicada por el Ministerio Nacional de Salud para el periodo 2009-2019 (Figura 3), se puede observar que la recolección de datos no siempre fue detallada, ya que en algunas oportunidades no se registraron los casos notificados y confirmados, sino los totales, que se pueden ver reflejados por año y regiones (Centro, Cuyo, NOA (Noroeste argentino), NEA (Noreste argentino) y Sur).

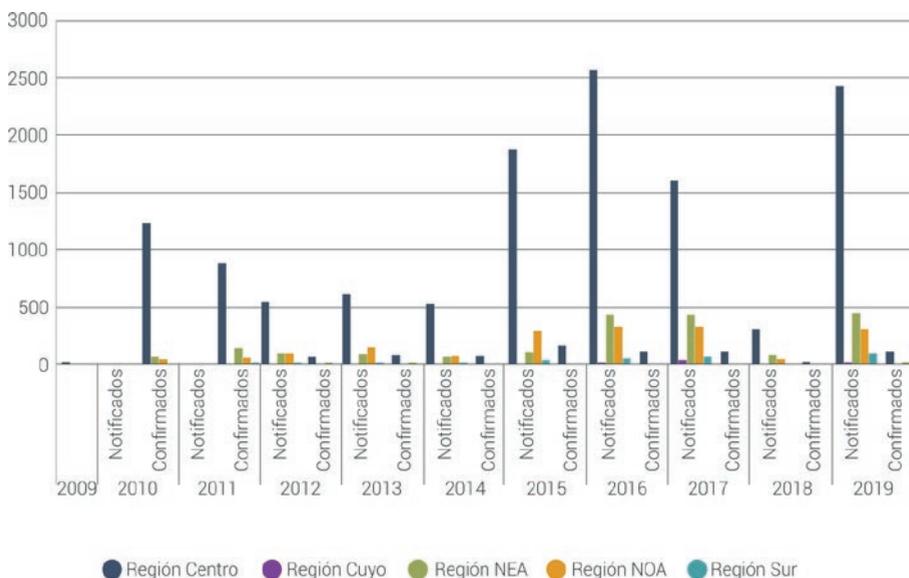


Figura 3. Distribución de casos notificados y confirmados (regiones: Centro, Cuyo, NEA, NOA y Sur) registrados por el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS)-Ministerio nacional de salud durante el periodo 2009-2019.

Se observa que la región con mayor cantidad de casos tanto notificados como confirmados en los años analizados (2009-2019) es la región Centro, no solo por presentar una mayor densidad poblacional, sino

también por presentar mayor acceso a laboratorios de diagnóstico e instituciones de salud. Las provincias incluidas en la región centro son: Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos y Córdoba. Las regiones NEA y NOA son las que siguen en cuanto a la cantidad de casos notificados como confirmados, estas regiones incluyen las provincias Corrientes, Chaco, Formosa y Misiones (región NEA) y Catamarca, Jujuy, La Rioja, Salta, Santiago del Estero y Tucumán (región NOA). La región con menos casos reportados es la región Sur conformada por las provincias Chubut, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego.

Existe una diferencia entre la cantidad confirmados y notificados durante el periodo analizado, esto se puede deber a los métodos de diagnósticos empleados, ya que la técnica *gold standard* es la técnica de microaglutinación (MAT), la cual requiere de una segunda muestra para la confirmación del caso, mediante la seroconversión. Tanto en salud pública como en sanidad animal se puede observar esta tendencia, lo cual refleja la necesidad de un método de diagnóstico innovador que no requiera de una segunda muestra, específico, sensible, robusto y de fácil interpretación. Este último punto se encuentra desarrollado en los capítulos III y VI.

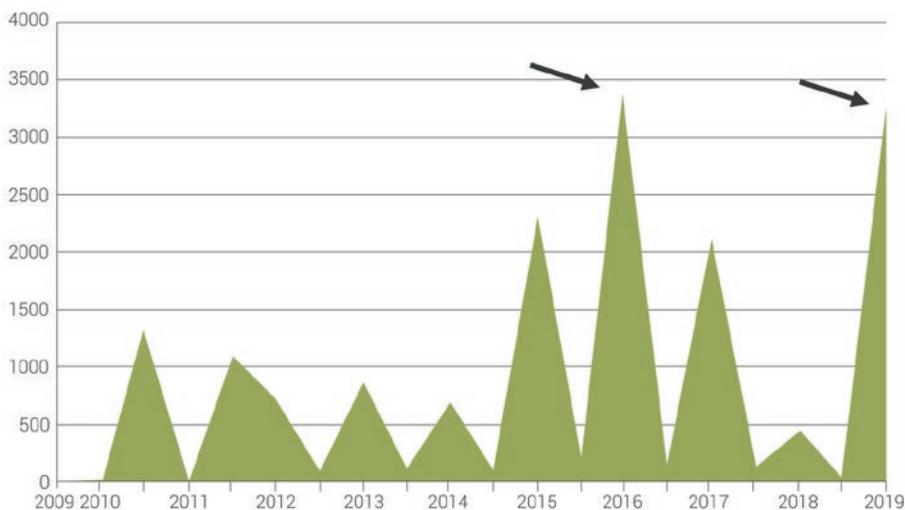


Figura 4. Casos acumulados totales por año (2009-2019) de leptospirosis humana reportadas en el país (datos obtenidos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. MSAL). Se resaltan con flechas negras los picos más altos registrados.

Al analizar la cantidad de casos totales registrados en el país (Figura 4) durante la escala temporal considerada, se observa que los años 2015, 2016, 2017 y 2019 son los de mayor cantidad de casos de leptospirosis registrados en el país manteniendo la tendencia de las regiones antes mencionadas. Esto se puede deber a una mayor tasa de precipitación debido al efecto de El Niño el cual empezó en mayo 2015 (Servicio Meteorológico Nacional, 2017). Durante el periodo de El Niño se registró un aumento de 3 grados de la temperatura del agua del Pacífico ecuatorial lo cual originó uno de los Niños más fuertes de la historia y el responsable de muchos de los fenómenos meteorológicos extremos que ocurrieron en la Cuenca del Plata durante 2015 y 2016 (lluvias intensas en la Mesopotamia argentina y graves sequías en el norte de Brasil (Sistema Nacional de Meteorología, 2017).

En un trabajo realizado por la coordinación de políticas socioambientales (2019) se recopiló información sobre el tema clima y salud en Argentina. En este trabajo indican que el principal factor de riesgo para contraer leptospirosis es el contacto prolongado con inundaciones, sin embargo, existen actividades y ocupaciones rurales que también son consideradas factores de riesgo. La leptospirosis es considerada una enfermedad controlable, pero no se puede erradicar (Harstkeerl y col., 2011). La exposición a las inundaciones favorece el desplazamiento de poblaciones de roedores y la propagación de las leptospirosis patógenas al medioambiente, esto facilita el contagio directo a través de lesiones en piel y conjuntivas.

Las medidas de prevención y control indicadas en el Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA son las siguientes:

- Evitar la inmersión en aguas estancadas potencialmente contaminadas y procurar que los niños no jueguen en charcos o barro.
- Combatir los roedores –principales agentes de contagio– en domicilios y alrededores.
- Utilizar guantes y botas de goma para realizar tareas de desratización, desmalezado o limpieza de baldíos.
- Mantener los patios y terrenos libres de basura, escombros y todo lo que pueda ser refugio de roedores.

En áreas rurales:

- Ante la aparición de abortos en los animales de producción, es necesario consultar al veterinario.
- Es importante usar siempre calzado al caminar sobre tierra húmeda, y botas altas en zonas inundadas o al atravesar aguas estancadas.
- Usar guantes cuando se realizan tareas de desmalezado y cosecha.
- En zonas endémicas, vacunar a los perros y al ganado bovino.

Se estima que un 10 % de los abortos bovinos anuales en el país son producidos por la leptospirosis. En el año 2011 Draghi y col. reportaron la muerte de 100 terneros de recría originado por *Leptospira interrogans* serovar Pomona.

El agente etiológico

Las leptospiras son microorganismos que se caracterizan por su motilidad y forma espiralada. Son filamentos delgados y flexibles de 6 a 20 μm de longitud y 0,1 μm de diámetro (Stanchi y col., 2007). En las Figuras 5 y 6 se pueden observar dos imágenes de leptospiras, una empleando la técnica de inmunofluorescencia directa y otra utilizando microscopia electrónica de barrido, respectivamente. *Leptospira* spp. tiene una envoltura celular similar a las bacterias Gram negativas, consiste en una membrana citoplasmática y otra externa. Sin embargo, la capa de peptidoglicano está asociada con la membrana citoplasmática en vez de la membrana externa, algo que es único de las espiroquetas (Faine, 1994; Levett, 2001).

Los dos flagelos presentes en leptospiras se extienden desde la membrana citoplasmática en los extremos de la bacteria, a través del espacio periplasmático y son necesarias para la motilidad del microorganismo (Picardeau y col., 2001). Las leptospiras patógenas de aislamientos recientes son más cortas y compactas y sus movimientos más rápidos que aquellas leptospiras que ya han sido subcultivadas (Faine, 1994). Las leptospiras giran alrededor de su eje y progresan en ambas direcciones. Se dividen por fisión binaria.

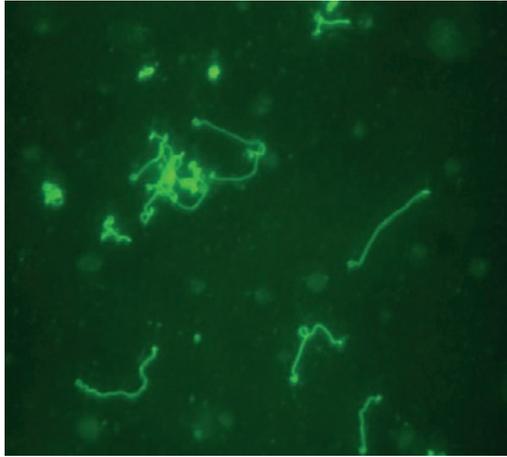


Figura 5. Imagen de un cultivo puro de leptospiras utilizando inmunofluorescencia directa (IFD) (200X). (Fuente: Brihuega y col., 2006).

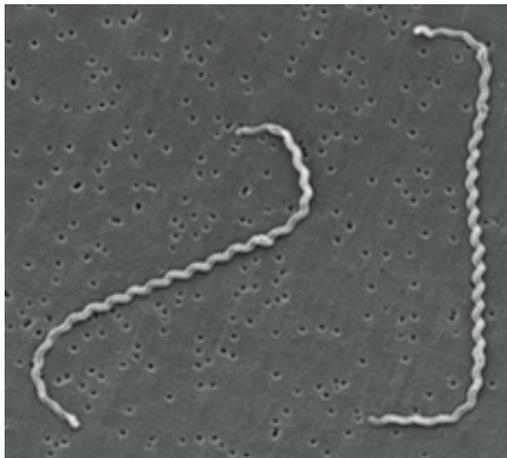


Figura 6. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de *Leptospira interrogans* cepa RGA. (Fuente: Adler y col., 2015, capítulo 3).

Las leptospiras sin colorear no son visibles al microscopio óptico de luz, pero sí se observan claramente en microscopios de campo oscuro o de contraste de fase. No se tiñen adecuadamente con las coloraciones de Gram, Wright o Giemsa, y sí se ven bien con técnicas de deposición de sales de plata como Levaditi o Warthin-Starry (Faine y Stallman, 1982).

Recientes aplicaciones de taxonomía molecular en este género de bacterias han revelado una extensa diversidad genética dentro de *Leptospira* spp. con más de 16 especies patógenas y saprófitas descubiertas (2008). Un reto importante a futuro es relacionar la correlación entre esta diversidad genética y las diferencias biológicas. La relación entre el contenido del genoma del género *Leptospira* spp., la patogénesis y su habilidad para sobrevivir en nichos ambientales diversos es un área especialmente importante de investigación (Picardeau y col., 2008). La capacidad de este género para adaptarse a diversos nichos ecológicos se manifiesta por presentar mecanismos únicos como es el sistema de transducción de señales codificado a lo largo de su genoma, lo cual permite que se adapte a resistir a condiciones de estrés fisiológico (Picardeau, 2017), esto se puede deber a la transferencia lateral de genes asociada a la adaptación a nuevos hospederos (Fouts y col., 2016).

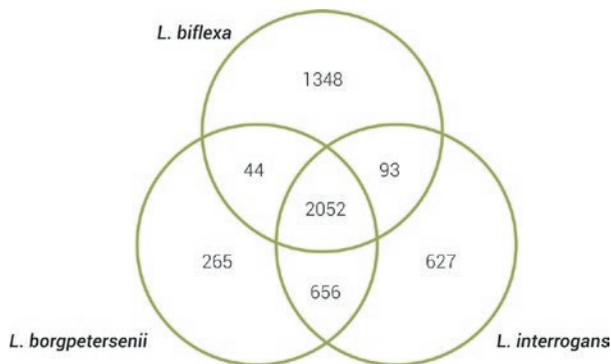


Figura 7. Gráfico que representa los genes compartidos entre tres genomas de *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*. (Fuente: Picardeau y col., 2008).

En el estudio comparativo sobre tres genomas realizado por Picardeau y col. (2008) se determinó que los genes compartidos entre las tres especies de *Leptospira* spp. (*L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*) son consistentes con un origen común para las leptospiros patógenas y saprófitas. Los genes conservados a lo largo de las tres especies se encuentran distribuidos en los dos cromosomas existentes en estas. En la Figura 7 se muestra un diagrama de Venn extraído de Picardeau

y col. (2008) en el cual se puede visualizar que existen 2052 genes que comparten estas especies. La especie con menos genes no identificados es *L. borgpetersenii*, esto se puede deber a que presenta un genoma significativamente más corto que las otras especies.

En la actualidad estudios sobre el genoma completo de las leptospiras (Whole Genome Sequencing-WGS) y enfocando los estudios genómicos sobre los factores de virulencia en los genes core (conjunto de genes que pueden ser base de una taxonomía) han reportado un total de 63 especies pertenecientes a este género de espiroquetas reclasificándolo nuevamente en especies patógenas (P1, P2) y saprofitas (S1, S2) siguiendo el criterio de presencia de genes de virulencia en cada grupo (Vicent y col., 2019). Hasta el momento se ha secuenciado el genoma completo de cerca de 70 especies pertenecientes al género *Leptospira* spp. Esto ha generado muchos datos que serán detallados en el capítulo IV.

Taxonomía y nomenclatura

En la actualidad la nomenclatura sobre este género bacteriano es según el subcomité de taxonomía de la sociedad internacional de leptospirosis (ILS, 2020):

Orden: Spirochaetales

Familia: Leptospiraceae

Género: *Leptospira*

Especie: *interrogans*

Serogrupo: Canicola

Serovariedad: Canicola

Cepa: Hond Utrecht IV

Se debe escribir en cursiva tanto el género como la especie (*Leptospira interrogans*), pero el género con inicial mayúscula mientras que con minúscula la especie. Según la ILS, no es necesario colocar el serogrupo, al cual pertenece la cepa aislada, pero sí la serovariedad (en mayúscula

y sin cursiva) y el nombre de la cepa referencial o aislada en mayúscula). Es decir, si queremos citar la especie colocada como en el ejemplo anterior se escribe: *Leptospira interrogans* Canicola cepa Hond Utrecht IV. Cuando se cita solo el género existen dos formas de escribirla, si hacemos referencia al género incluyendo varias especies se coloca *Leptospira* spp., y si hacemos referencia al género, pero considerando una sola especie *Leptospira* sp.

Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa de relevante importancia en la salud pública y es considerada la zoonosis de mayor distribución mundial. Esta enfermedad puede ser transmitida al hombre principalmente por alguna de estas causas: inadecuado manejo sanitario de desechos metabólicos de animales de producción, silvestres, mascotas o contaminación de efluentes por desechos animales como la orina. Por lo tanto, el punto de partida para la diseminación de la leptospirosis es la presencia de un portador (Stanchi y col., 2007). Estos, ya sean animales domésticos o silvestres, eliminan leptospiras con la orina en forma discontinua y por periodos variables. De esta manera se efectiviza la infección directa a otros animales, de la misma u otras especies, como así también al hombre (Faine, 1982; Levett, 2001).

En la Figura 8 se puede observar que la presencia de leptospiras en orina de reservorios (ratones/ratas) puede mantenerse durante meses o años. En este diagrama se puede visualizar la naturaleza bifásica de la leptospirosis, leptospiremia y leptospiruria. La primera fase es la inicial al contagio, por lo que se puede encontrar mayor presencia de leptospiras en el torrente sanguíneo y en segunda fase se pueden encontrar los anticuerpos antileptospira generados por el sistema immune. Es muy importante conocer la naturaleza de esta enfermedad, ya que en la primera fase se pueden aplicar métodos de diagnósticos moleculares que tengan como objetivo la detección de ADN presente en las muestras y en la segunda fase, métodos serológicos que detecten la presencia de anticuerpos.

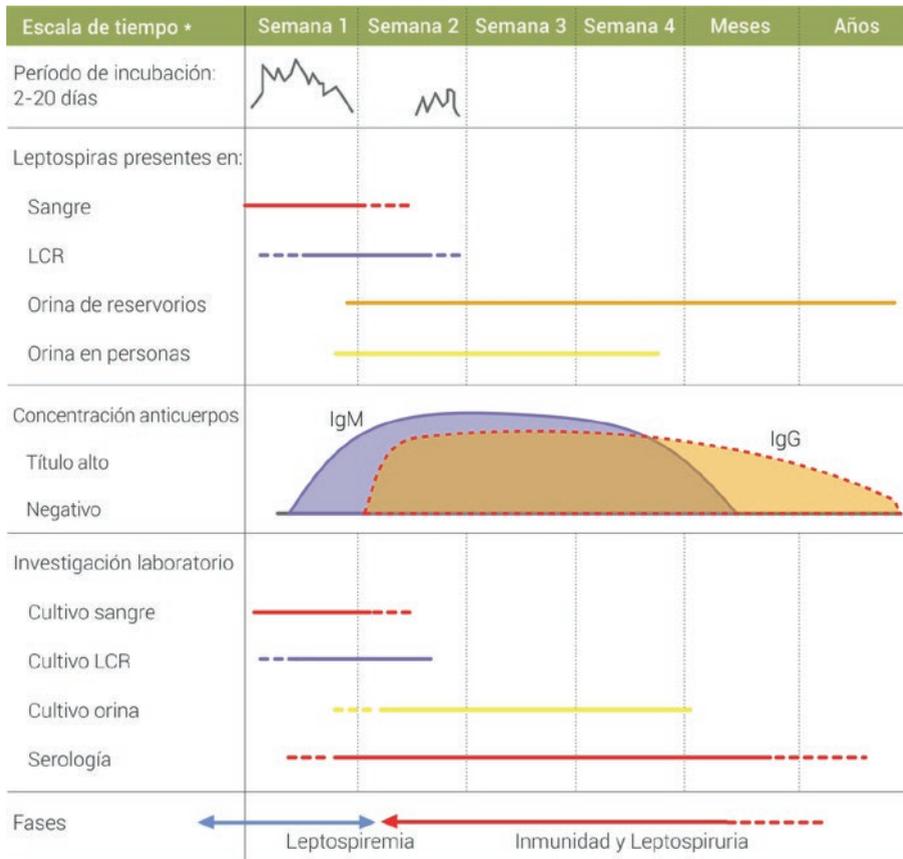


Figura 8. Diagrama representando la presencia de leptospiras después del contagio en sangre, orina y generación de anticuerpos antileptospira. (Fuente: Céspedes, 2005).

En Seijo (2015) se describe la primera fase en humanos (bacteremia-leptospiremia) mediante una respuesta inflamatoria inespecífica y que causa una vasculitis, el cuadro clínico puede manifestarse con los síntomas: síndrome febril agudo o pródromos con hipertermia aguda, mialgias, cefalea, dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea e hiperemia conjuntival con ausencia de afección en las vías respiratorias superiores (2-5 días poscontagio). En la segunda fase (leptospiruria) existen otros mecanismos de daño tisular: ictericia colostática, insuficiencia renal, meningitis "aséptica", hemorragias, miocarditis y neumonía, frecuente neutrofilia, trombopenia y velocidad de sedimentación elevada. En este atlas se resumen los métodos de diagnóstico aplicados para la

detección de leptospirosis humana recomendadas para el diagnóstico durante la primera fase: PCR, hemocultivos y serología por MAT. Durante la segunda fase: urocultivo, y una segunda muestra suero para poder confirmar la seroconversión.

Esta enfermedad es común en el ganado, las mascotas y los animales silvestres. La enfermedad está presente en bubalinos, caprinos y caninos. Las consecuencias de una infección con leptospiras pueden ser: nefritis, ictericia, desórdenes reproductivos, abortos, natimortos y debilidad en terneros (Faine, 1999). En equinos y en pequeños ruminantes puede producir abortos y en porcinos abortos y natimortos.

En el ganado lechero reduce la producción de leche generando mastitis, abortos y pariciones prematuras. Es por ello que una campaña de vacunación eficiente requiere la realización de estudios epidemiológicos para determinar la magnitud del problema y a su vez conocer las distintas serovariedades que circulan en una determinada región. En Argentina ocurren con frecuencia brotes de leptospirosis animal y humana, pero es poco lo que se conoce acerca de sus relaciones epidemiológicas. Nuestro país carece de un programa nacional, lo que nos pone en desventaja con respecto a otros países competidores con un altísimo estándar en salud animal, como Australia o Nueva Zelanda.

La enfermedad posee un gran potencial zoonótico debido al contacto del hombre con los animales domésticos. Durante un brote pueden estar involucradas en la circulación de leptospiras varias especies animales que vivan en biocenosis (Brihuega, 2011). Hay una relación simbiótica entre la leptospira y su hospedador que es de gran importancia para la perpetuación de la enfermedad en la población animal. Este es un equilibrio biológico entre algunas cepas de leptospiras y ciertas especies animales en las cuales persisten en los túbulos contorneados renales, sin producir efecto patógeno en su epitelio. Este equilibrio se instala solo en ciertos casos, mientras que en otros se pierde o es mucho más difícil de comprobar; el animal padece una forma severa de la enfermedad, que incluso le puede ocasionar la muerte. Para la epidemiología hay dos factores decisivos: la eliminación de leptospiras con la orina de los animales infectados y la supervivencia de los gérmenes fuera del organismo.

Los animales silvestres también son importantes reservorios que eliminan leptospiras a través de la orina al medioambiente. Entre los

mamíferos, los roedores (ratas, ratones) son los reservorios más importantes (Sterling, 1981; Faine, 1982; Rossetti y col., 2004). También los zorros, armadillos, comadrejas, cuises, animales poiquilotermos y mamíferos marinos mantienen las leptospiras en un determinado medio (Coulagross-Schouten, 2002; Lilenbaum y col. 2002; Stanchi y col. 2007; Brihuega y col. 2007; Zamora y col., 1999). En Argentina se han reportado diferentes especies de animales silvestres con serología positiva a leptospirosis mediante la técnica de microaglutinación (MAT), por esto es muy importante el intento de aislamiento y la identificación de la especie aislada. La importancia que reviste en la difusión de la leptospirosis la presencia de portadores entre las diversas especies de animales silvestres se pone de manifiesto frente a las continuas investigaciones y aislamientos de cepas que se obtienen de estos animales. Estudios realizados previamente demuestran que algunos animales silvestres han estado en contacto con leptospiras, pudiendo ser potenciales focos de diseminación (Cacchione y col., 1965; Levett, 2001; Martin y col., 2002; Brihuega y col., 2007; Marder y col., 2008; Scialfa y col., 2010; Li y col., 2012; Jorge y col., 2012; Grune y col., 2014 y 2015).

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las serovariedades de *Leptospira* spp. reaccionantes en animales silvestres de Argentina mediante la técnica serológica de microaglutinación (MAT).

Tabla 1. Listado de las serovariedades reaccionantes a *Leptospira* spp. en hospederos silvestres.

Hospedero (animal silvestre)	Serovariedades reaccionantes	Referencia
Liebres patagónicas	<i>Leptospira interrogans</i> Castellonis, <i>Leptospira interrogans</i> Bratislava, <i>Leptospira interrogans</i> Wolffi y <i>Leptospira interrogans</i> Butembo	Brihuega y col., 1984
Ciervos colorados	<i>Leptospira interrogans</i> Castellonis, <i>Leptospira interrogans</i> Pomona y <i>Leptospira interrogans</i> Grippotyphosa	Brihuega y col., 2003
Ofidios	<i>Leptospira biflexa</i> Patoc, <i>Leptospira interrogans</i> Wolffi, <i>Leptospira interrogans</i> Tarassovi, <i>Leptospira interrogans</i> Pomona, <i>Leptospira interrogans</i> Pyrogenes, <i>Leptospira</i> Shermani, <i>Leptospira</i> Andamana	Stanchi y col., 1986
Caimán	<i>Leptospira</i> Sarmin, <i>Leptospira</i> Pyrogenes, <i>Leptospira</i> Ranarum	Rossetti y col., 2003
Armadillo o Peludo (<i>Chaetopractus villosus</i>)	<i>Leptospira hardjo</i> y <i>Leptospira canicola</i>	Cacchione y col., 1966
Sapo (<i>Bufo arenarum</i>)	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Cynopteri	Stanchi y col., 1991



CAPÍTULO II

Caracterización molecular
de leptospiras patógenas



La clasificación de leptospiras ha cambiado significativamente desde la incorporación de herramientas moleculares para la detección y tipificación de este agente zoonótico. A partir de la década de 1990 se desarrollaron diversas técnicas para poder determinar las especies patógenas y saprófitas presentes en el género *Leptospira* spp. En el año 1987, Yasuda y col. implementaron la hibridización de DNA-DNA genómico para poder determinar la cantidad de especies presentes en el género *Leptospira* spp. En ese estudio encontraron que *L. interrogans*, anteriormente *sensu lato*, presentaba por lo menos seis especies. Es a partir de este momento que se empezó a utilizar la denominación de *sensu stricto* para *L. interrogans*. Basados en estudios posteriores de hibridización se han descrito un total de 20 especies para el género *Leptospira* spp. (Perolat y col., 1998; Brenner y col., 1999; Levett y col., 2005, 2006; Matthias y col., 2008; Slack y col., 2006, 2009). Con estos hallazgos se generó un conflicto taxonómico entre la tipificación serológica y la genotípica, dado que un serogrupo puede estar presente en diferentes especies de *Leptospira* spp. Por ejemplo, las 14 serovariedades descritas de Bataviae se encuentran en *L. interrogans sensu stricto* (5 serovariedades), *L. santarosai* (5 serovariedades), *L. kirschneri* (1 serovariedad), *L. noguchii* (2 serovariedades), *L. borgpetersenii* (1 serovariedad).

Esto sugiere, que los genes determinantes de los serotipos podrían ser transferidos de manera horizontal entre especies (Ralph y McClelland, 1994; Haake y col., 2004; Cerqueira y Picardeau, 2009; Picardeau y col., 2008), sin embargo, aún es desconocido el mecanismo responsable de este intercambio génico de los determinantes del género *Leptospira* (ver capítulo IV). El sistema de clasificación basado en similitudes génicas se está usando en conjunción con la clasificación clásica por antígenos.

A continuación, se resumen los métodos de tipificación molecular usados con leptospiras. Diversos métodos de PCR y electroforesis de campo pulsado en gel se han implementado desde los 90 para poder tipificar a nivel genotípico. Estas técnicas se encuentran publicadas en la *Guía de herramientas moleculares y tipificación de leptospiras, (grupo de leptospirosis, 2018)*.

Ribotyping: este método consta en determinar los perfiles de longitud de los fragmentos de restricción de ADN cromosomal digerido probados con rRNA (Cerqueira y Picardeau, 2009). *Leptospira* spp. tiene dos sets de 16S y 23S y uno o dos para el gen 5S rARN, pero no están relacionados cercanamente y se encuentran dispersos a lo largo del cromosoma. Dado el bajo número de genes rARN, este método de tipificación no cuenta con un poder muy discriminatorio entre especies.

Inserción de secuencias (IS): este método, basado en elementos de inserción de secuencias, toma valor agregado en estudios epidemiológicos. Los elementos IS1500 y IS1502 fueron identificados para *L. interrogans* y para *L. borgpetersenii* IS1533. El número de copias varía entre serovariedades y entre aislamientos de un determinado serovar. Este método puede discriminar serovariedades de diferentes especies de *Leptospira* spp. y entre serovares de una especie de *Leptospira* spp. determinada. La reciente secuenciación de los genomas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* y la saprófita *L. biflexa* permitió la identificación de varios elementos IS de un amplio rango de familias IS (Zuerner y col., 1995).

Análisis de endonucleasas de restricción y electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE): métodos no basados en análisis de secuencias, incluyen la comparación de perfiles de restricción en geles de agarosa o de acrilamida. El análisis de endonucleasas de restricción (REA-sigla en inglés) de ADN genómico completo ha demostrado ser un método confiable para tipificar algunas cepas de *Leptospira* spp. (Cerqueira y Picardeau, 2009). Sin embargo, esta técnica es muy laboriosa y requiere de grandes cantidades de cultivo. La gran cantidad de bandas presente dificulta la interpretación y la comparación entre laboratorios. Los patrones de PFGE obtenidos para determinado serovar son únicos de ese serovar. Sin embargo, se han reportado discrepancias entre métodos serológicos y PFGE, por ejemplo, el PFGE no aparenta poder discriminar entre sí los serovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans* (Galloway y Levett, 2008). A pesar de esto casi el 90 % de los serovares pueden ser identificados con base en sus únicos patrones de PFGE.

Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y PCR con primers arbitrarios (AP-PCR): estos métodos de fingerprinting de cepas de *Leptospira* spp. dan resultados consistentes con el análisis de secuencias de 16S rARN y análisis de similitud de secuencias ADN-ADN (Cerqueira

y Picardeau, 2009). Este método discrimina entre especies de leptospi-
ras, representa una técnica simple y rápida para su identificación como
también para comparar entre serovares. Estos métodos son una herra-
mienta útil para estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, este
método es costoso para estudios de gran escala y su reproducibilidad
es baja, lo cual dificulta la comparación de resultados entre laboratorios.

Análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP): este método también es llamado análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP). Estos análisis implican un procedimiento de tres pasos en los cuales el ADN genómico se digiere con enzimas de restricción, se le ligan adaptadores y luego se amplifican fragmentos para la generación de *footprints* de las cepas. Este método utiliza el análisis computarizado del gel, lo cual facilita su análisis por clusters. Una desventaja de esta técnica es que requiere de mucha más cantidad de cultivo (templado) que otros métodos de PCR.

Tipificación de secuencias en múltiples locus (MLST): este método está basado en secuencias parciales de diversos genes constitutivos o *housekeeping*. Dos sets de genes han sido implementados *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs* y *secY* y el otro set está constituido por: *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* y *fadD*. El MLST puede ser usado para identificar clusters de aislamientos cercanamente relacionados en brotes y epidemias. Este método no requiere de grandes cantidades de ADN purificado, pero requiere de un cultivo del aislamiento para caracterizar. Es altamente reproducible entre laboratorios.

Análisis de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA): este análisis utiliza los locus VNTR (repeticiones en tándem de número variable) para tipificar las serovariedades presentes en las diferentes especies de *Leptospira* spp. Un análisis de la base de datos de repeticiones en tándem mostró que el genoma de *L. interrogans* presenta muchas secuencias repetitivas de menos de 100 pb de longitud. Estas repeticiones son altamente útiles para analizar los polimorfismos basados en la electroforesis de los productos de PCR obtenidos. El MLVA es utilizado solo para especies patógenas de *Leptospira* spp. y puede discriminar entre serovares. Estudios posteriores deberán evaluar la estabilidad de estos microsatélites a lo largo de tiempo y distribución geográfica. Esta téc-

nica es considerada altamente reproducible entre laboratorios y es una técnica que puede ser empleada en laboratorios clínicos como también en centros de investigación en países en desarrollo. La desventaja de esta técnica es que requiere de un aislamiento previo de la leptospira y por ende no puede ser utilizado directamente sobre muestras biológicas.

Se describe en este capítulo la genotipificación mediante Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis (MLVA), análisis que ha sido usado con buenos resultados para la estratificación de genotipos en otros agentes bacterianos patógenos: *Clostridium botulinum* (Fillo y col., 2011), *Clostridium difficile* (Koene y col., 2011), *Streptococcus agalactiae* (Haguenoer y col., 2011), *Ehrlichia ruminantium* (Nakao y col., 2012), *Staphylococcus aureus* (Lü y col., 2013), *Bacillus anthracis* (Antwerpen y col., 2011), *Streptococcus pneumoniae* (Van Cuyck y col., 2012), *Yersinia pestis* (Zhang y col., 2009), *Salmonella enteritidis* (Campioni y col., 2013) y *Salmonella enterica* (Kruy y col., 2011).

Tabla 2. Comparación entre las técnicas de tipificación molecular utilizadas para leptosiras.

	MLVA	MLST	AFLP	RAPD	AP-PCR	PFGE	IS	RIBO-TYPING
ADN necesario	Poco	Poco	Poco	Poco	Mucho	Mucho	Moderado	Moderado
Calidad del ADN	Alta	Alta	Moderada	Moderado	Alta	Alta	Moderada	Moderada
Se basan en PCR	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Clonado y Secuenciación	No	Sí	No	No	Sí	No	Sí	No
Nivel de polimorfismo	Alto	Alto	Medio	Medio	Alto	Medio	Bajo	Bajo
N.º de loci polimórficos analizados	12	13	20-100	1,5-50	5	4	3	3
Confiabilidad	Alta	Alta	Mediano	Baja	Mediana	Baja	Alto	Baja
Nivel de destreza	Mediano	Mediano	Mediano	Bajo	Bajo	Alto	Mediano	Bajo
Costo por muestra	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Bajo
Reproducibilidad	Alta	Alta	Mediana	Baja	Baja	Baja	Mediana	Baja

Múltiple-Locus Variable-number tandem repeat Análisis (MLVA)

Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada anteriormente con el fin de determinar el tipo molecular de *L. interrogans* sentido estricto (Majed y col., 2005; Pavan y col., 2008; Pavan y col., 2011a y 2011b). En la Figura 9 se muestran los primers utilizados para la amplificación de los marcadores y sus características.

VNTR Locus	Primers (5' -3')	Posición en el CI (pb)	Largo de la unidad (pb)	Número de copia	Largo total del producto de PCR	Número de alelos/51 serovares	Rango del número de copia en serovares de <i>Leptospira interrogans</i>
VNTR 4	4a (CAAATCAGTCACTACCCTG) 4b (CTTTGTTGGAGCGCAATCTC)	1122221-1122580	34	5	362	10	0-23
VNTR 7	7a (TCATCTGCTCCGGAGATTCCG) 7b (TCCCTCCACAGGTTGTCTTG)	3312338-3312035	46	3	304	15	0-14
VNTR 9	9a (TCGCTCTACAGTCCGGTGT) 9b (GGTGAAGAGCAAACCTTTGG)	2652531-2652151	46	4	381	13	1-13
VNTR 10	10a (TCCAAAATTCAGCCCTCAAG) 10b (GACGCTTGGCATTGTATCC)	1666395-1666157	45	2	239	15	1-18
VNTR 11	11a (ACAGAAGCCGTCTCATTTTG) 11b (CACAGTCCGGAATTTGTCA)	167476-167184	45	4	293	7	1-11
VNTR 19	19a (CAGAAACAAGAGGGAAGATTC) 19b (ACTCTCATTTAAGAGTGGCTG)	2877449-2877029	47	6	421	15	1-18
VNTR 23	23a (TTTCCAATATACTACTCGG) 23b (GCAAGAGAATTATTGGGATGG)	2179070-2178732	46	5	339	13	0-14
VNTR 31	31a (TTCATGAAGTCCCGAAAAC) 31b (ACGTGAGTTCGACCATGATTC)	2729699-2730370	77	4	671	ND*	ND

ND* , no determinado (VNTR 31 fue usado para diferenciar entre *L. interrogans* Canicolas y Portlandvere del serogrupo Canicola.

Figura 9. Imagen de la tabla 2 de Majed y col., (2005) (modificada), se indican los primers utilizados y su posición dentro del CI de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae Lai, el tamaño del producto de PCR a obtener y el rango de las repeticiones.

Para las especies *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii* se utilizaron los cebadores (primers) propuestos por Salaün y col. (2006) para flanquear los siguientes VNTRs: 4bis, 7bis, 10bis, Lb4 y Lb5 (Figura 10). El procedimiento de determinación de genotipos de las cepas aisladas mediante MLVA se realiza utilizando dos sets de primers para flanquear un total de 12 loci: VNTR4 y 4bis, VNTR7 y 7bis, VNTR9, VNTR10 y 10bis, VNTR19, VNTR23 y VNTR31, VNTR Lb4 y VNTR Lb5. No se utiliza el VNTR11 indicado en Majed y col. (2005), ya que los primers presentaban unas bases erróneas y estudios posteriores realizados en el país no lo incluían (Pavan y col., 2008 y Pavan y col., 2011).

Para poder comparar los códigos de repeticiones obtenidos en la caracterización molecular llevada a cabo MLVA se deben usar los mismos loci flanqueados, ya que esto posibilita el posterior análisis filogenético y el intercambio de códigos a nivel de interlaboratorios.

Locus	Primers	<i>L. interrogans</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
VNTR 4bis	4a_bis (AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA) 4b_bis (ATAAAGGAAGCTCGGCGTTT)	425 + 34n	425 + 34n	425 + 34n
VNTR 7bis	7a_bis (GATGATCCCAGAGAGTACCG) 7b (TCCCTCCACAGGTTGTCTTG)	299 + 46n	299 + 46n	Sin producto
VNTR 10bis	10a_bis (GAGTTCCAGAAGAGACAAAAGC) 10b_bis (ACGTATCTTCATATTCTTTGCG)	420 + 46n	347 + 46n	333 + 46n
VNTR Lb4	Lb4a (AAGAAGATGATGGTAGAGACG) Lb4b (ATTGCGAAACCAGATTCCAC)	Sin producto	Sin producto	573 + 60n
VNTR LB5	Lb5a (AGCGAGTTCGCTACTTGC) Lb5b (ATAAGACGATCAAGGAAACG)	668 + 39n	668 + 39n	722 + 36n

El tamaño del producto de PCR para la región flanqueante del VNTR + (tamaño de la repetición), siendo n el número de repeticiones.

Figura 10. Imagen de la tabla 1 de Salaün y col., 2006 (modificada), indica los primers utilizados y los productos esperados para *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii*.

Los datos sobre los componentes de la mix que se emplearon se pueden encontrar detallados en el capítulo VI (protocolos de PCR) como también el programa del termociclado. Para la tipificación de cepas aisladas de leptospiras patógenas llevando a cabo el MLVA se hizo una

modificación a partir de los trabajos utilizados como referencia (Majed y col., 2005 y Salaün y col., 2006). En estos trabajos se amplificó un VNTR por distintas cepas, obteniendo los pesos moleculares de la amplificación de ese locus en las distintas muestras. La variación realizada consistió en utilizar ambos sets de oligonucleótidos indicados previamente por muestra (cepa). Obteniendo de esta manera el perfil de los loci flanqueados por cepa en un gel único. Los amplicones obtenidos pueden ser conservados a -20 °C y reutilizados por hasta 6 meses.

Los tamaños alélicos se calcularon mediante un marcador de peso molecular de ADN de 100 pares de bases (bp) y el programa de libre distribución GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com>) para obtener los valores exactos de los pesos moleculares (pb) de los amplicones; posteriormente se calculó el número de copia de repetición mediante la fórmula:

Número de repeticiones (pb) = [Tamaño de fragmento (pb) – Regiones de flaqueo (pb)] / Tamaño de repetición (pb).

A partir de esta fórmula y las indicaciones de los tamaños de 0 repeticiones por loci flanqueado en los trabajos de Majed y col. (2005) y Salaün y col. (2006) se elaboraron dos tablas de repeticiones (Anexos A.1 y A.2).

Protocolos de extracción y purificación de ADN

Existen diversos protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de cultivos vivos. Algunos incluyen el uso de fenol/cloroformo y otros utilizan directamente un kit para la extracción. Se ha puesto a punto el método de purificación y extracción de ADN empleando dos protocolos aplicados a dos situaciones distintas. Cuando el cultivo, (independientemente si se encuentra en medio líquido o semisólido) presenta buen crecimiento, se toma directamente una alícuota de 20/50 µl de la parte central del cultivo, donde se encuentra la mayor concentración de leptospiras, y se transvasan a tres eppendorf de 0,5 ml de PCR de pared delgada (previamente preparados de Chelex-100, ver capítulo V). Otro método de extracción es usar 0,5ml/1ml del cultivo e incubarlo a 100 °C durante 10 minutos para lisar las bacterias y liberar el ADN.

Para visualizar si el cultivo se encuentra en óptimas condiciones para tipificar se toman los siguientes criterios:

- a. En un cultivo líquido (medio EMJH) se puede observar una densa nube tornando el cultivo turbio, al agitarlo suavemente y se puede observar que esta nubosidad es móvil, se puede afirmar que el cultivo está crecido y se observa con microscopio de campo oscuro.
- b. En el caso de cultivos semisólidos (medio Fletcher) se forman anillos con distinta densidad, se pueden observar anillos más finos por encima y debajo del anillo centralizado y más grueso, denominados anillos Dinger (Figura 11). También en este caso cuando podemos observar estas características podemos afirmar que el cultivo está crecido y se confirma mediante la observación con microscopio a campo oscuro.

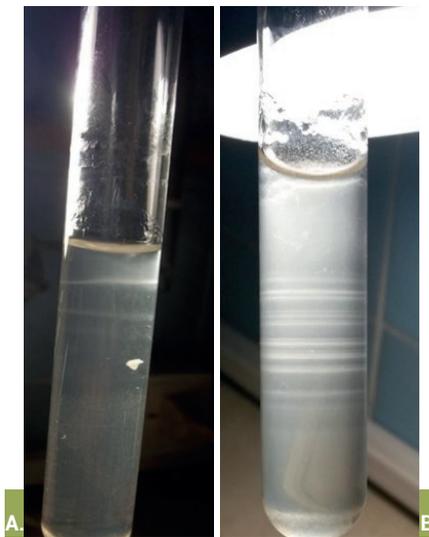
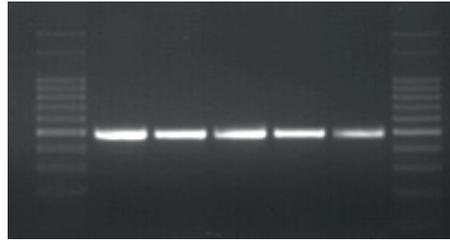


Figura 11. Fotografías de cultivos de dos cepas aisladas en la cuales se puede observar el anillo dinger en medio semisólido Fletcher. A. Cultivo, en el cual se puede observar el fragmento del riñón sembrado. B. Cultivo, con años de estabilidad en el medio Fletcher.

Para poder verificar la sensibilidad de la PCR a partir de ADN extraído utilizando el protocolo de purificación con la resina Chelex-100, se tomó como templado la cepa Rat454 con una concentración de ADN de 115 ng/ μ l y se realizaron diluciones de 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 y 1/50 (Figura 14).



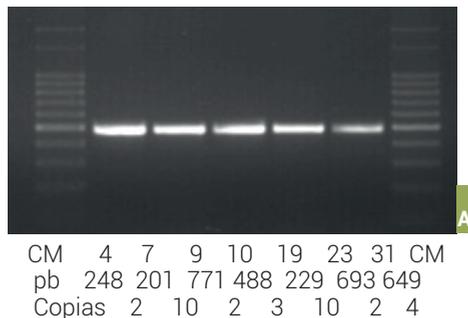
CM 1/2 1/5 1/10 1/20 1/50 CM

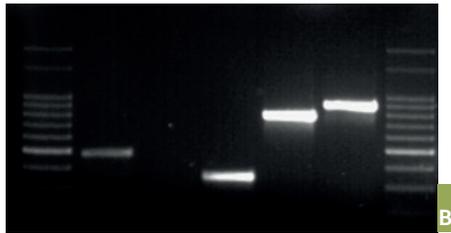
Figura 12. Imagen del gel que representa la sensibilidad de amplificación de la cepa Rat454 VNTR 4bis diluida (500 pb) (CM: marcador molecular de 100 pb).

Revelado de amplificaciones y análisis de geles

Los geles se preparan al 2 % de agarosa en 100 ml de TAE al 1X (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) y se le añaden 3 μ l de bromuro de etidio líquido (Promega, Cat.:H5041). Una vez endurecido el gel, se puede empezar con la siembra de los productos de PCR. Se mezcla 1 gota (1 μ l) del buffer de siembra (loading buffer) con 15 μ l del producto de PCR, esta mezcla se siembra en cada pocillo y se deja correr el gel durante 60 min a 100 V. El buffer de siembra utilizado se prepara siguiendo las indicaciones detalladas en el capítulo VI. La primera calle de cada set de reacciones debe tener el Cienmarker (CM) para luego poder calcular el tamaño de la banda (amplificación).

Al terminar la corrida del gel se pueden ver las amplificaciones directamente en el transiluminador con cabina cubierta (Uvi-Tec). Se toma la foto teniendo en cuenta que la posición del gel sea la más recta posible, ya que mediante esta imagen se calculan los pesos moleculares de cada banda utilizando el programa GelAnalyzer 2010a.





CM 4bis 7bis 10bis Lb4 Lb5
 pb 478 - 362 776 935
 Copias 1 - 1 4 6

Figura 13. Imágenes de los geles de agarosa al 2 % donde se corrieron las ampliificaciones (utilizando el set de primers de Majed y col. (2005)) de cepa Roedor 1507 aislada del riñón de *Rattus norvegicus* (Rata gris) en la provincia de Buenos Aires en el 2010 (A) y de cepa MP441 aislada del riñón de *Oligoryzomys flavescens* (ratón) en la provincia de Buenos Aires en el 2012 (utilizando el set de primers de Salaün y col. (2006)) (B).

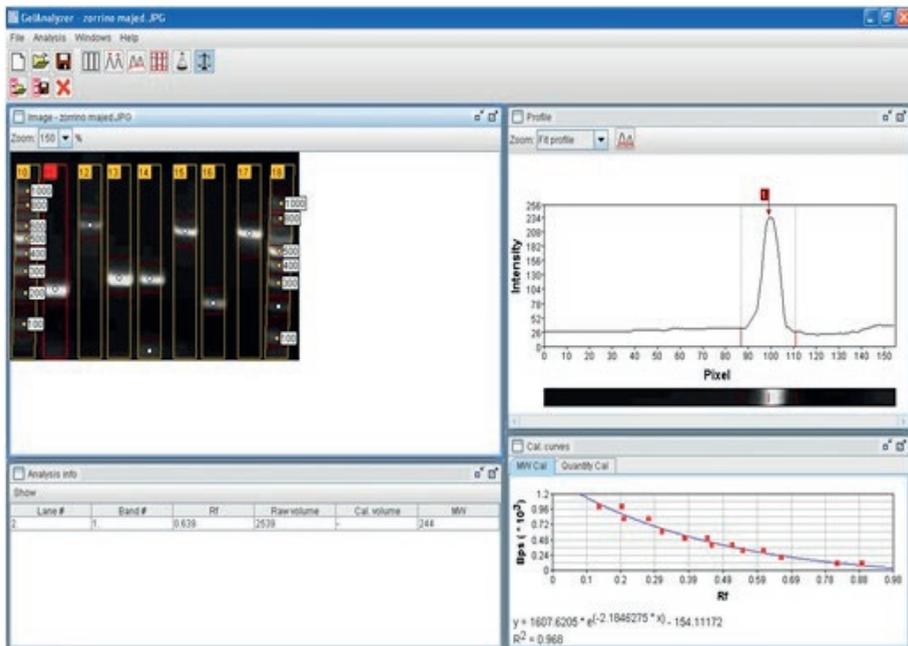


Figura 14. Imagen de pantalla utilizando el programa Gelanalyzer al calcular los valores del tamaño de la banda (en pb) de cada locus flanqueado.

En la Figura 14 se puede ver una impresión de pantalla del programa GelAnalyzer. La imagen del gel es analizada mediante el programa, el cual calcula el valor exacto del tamaño de la banda seleccionada. Los valores de los pesos del cienmarker deben ser indicados al programa para el cálculo del tamaño de banda.

Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizaron un total de 65 genotipos determinados (ver Anexo B) se construyeron dos árboles filogenéticos basados en una matriz de distancias generada en el complemento de Excel-GenAlEx 6 (Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research, <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). Este paso previo a la generación de los árboles se debe incluir ya que no se está trabajando con secuencias, sino con genotipos caracterizados por un código de números. Esta matriz de distancia triangular es ingresada en formato .txt al programa MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) y transformada en formato .meg. Una vez realizado este paso se puede proceder a la construcción de los árboles filogenéticos. El apareamiento de los genotipos se realiza basado en el método de UPGMA, el cual agrupa los genotipos por afinidad genética y la cercanía entre sí, formando clados de distinto largo de brazo representando las distancias. Se presentan dos árboles, uno (Figura 15) tomando en cuenta los genotipos representados por *L. interrogans* amplificados mediante 7 loci indicado previamente en este capítulo, y otro árbol que unifica los genotipos representados de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni Fio-cruz L1-130 y serovar Icterohaemorrhagiae RGA (Figura 16). En el primer árbol se pueden observar tres clados principales, en la parte superior del árbol se encuentra el clado del serogrupo Icterohaemorrhagiae, seguido del Pomona y en la parte inferior del Canicola. Las cepas que no presentan un perfil idéntico a los perfiles de las cepas referenciales no son incluidas en el árbol filogenético (Cuis, Peludo, RatBa, Zorro).

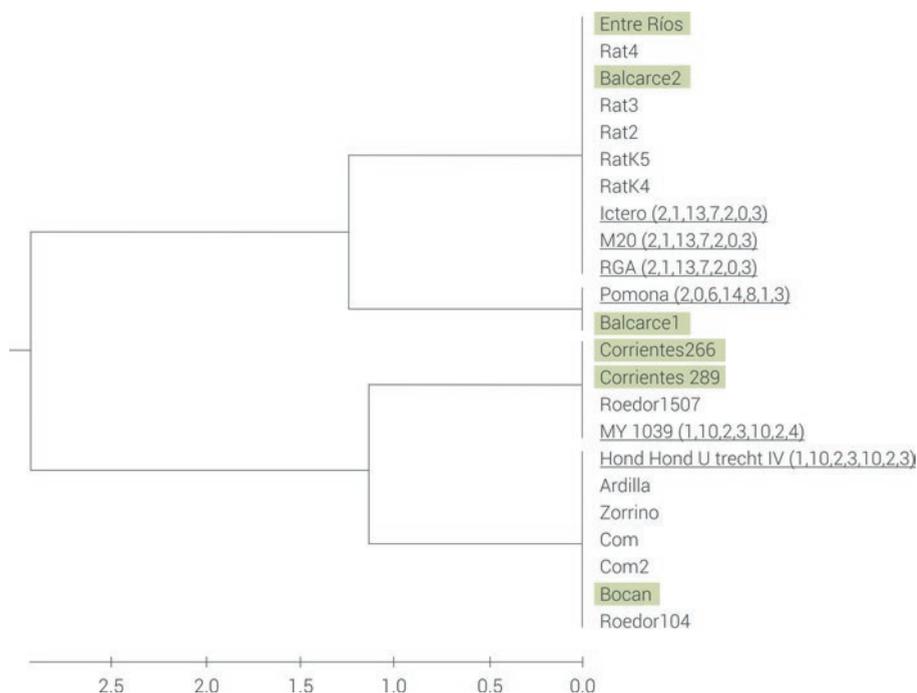


Figura 15. Árbol creado por UPGMA de los genotipos representados en la especie *L. interrogans*. Las cepas provenientes de animales de producción se encuentran resaltadas en color verde. Las cepas de referencia se encuentran subrayadas y se presenta entre paréntesis, el número de repeticiones de los VNTRs: 4, 7, 9, 10, 19, 23 y 31.

En el árbol presentado en la Figura 15 se puede observar la composición de los genotipos tipificados utilizando el set de 7 primers, flanqueando los loci (VNTRs) 4, 7, 9, 10, 19, 23 y 31 (Majed y col., 2005). Estos genotipos pertenecen todos a la especie *L. interrogans*, encontrándose en la parte superior del árbol, las cepas con perfil idéntico a Icterohaemorrhagiae M20/RGA/ICTERO I, compuesto por cepas aisladas de ratas (RatK4, RatK5, Rat 2, Rat 3 y Rat 4) y bovinos (Balcarce 2 y Entre Ríos). Seguido a este grupo, se encuentra una cepa aislada de un bovino (Balcarce 1), la cual presenta un perfil idéntico al genotipo de Pomona. En la parte inferior del árbol se pueden observar los genotipos pertenecientes al serogrupo Canicola, compuesto por las cepas referenciales *L. interrogans* serovar Portlandvere MY1039 y *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV. En el clado Canicola encontramos un total de nueve aislamientos, obtenidos de bovinos (Bocan, Corrientes 266 y Corrientes

289), dos comadrejas (Com y Com2), dos ratas (Roedor 104 y Roedor 1507), una ardilla y un zorrino.

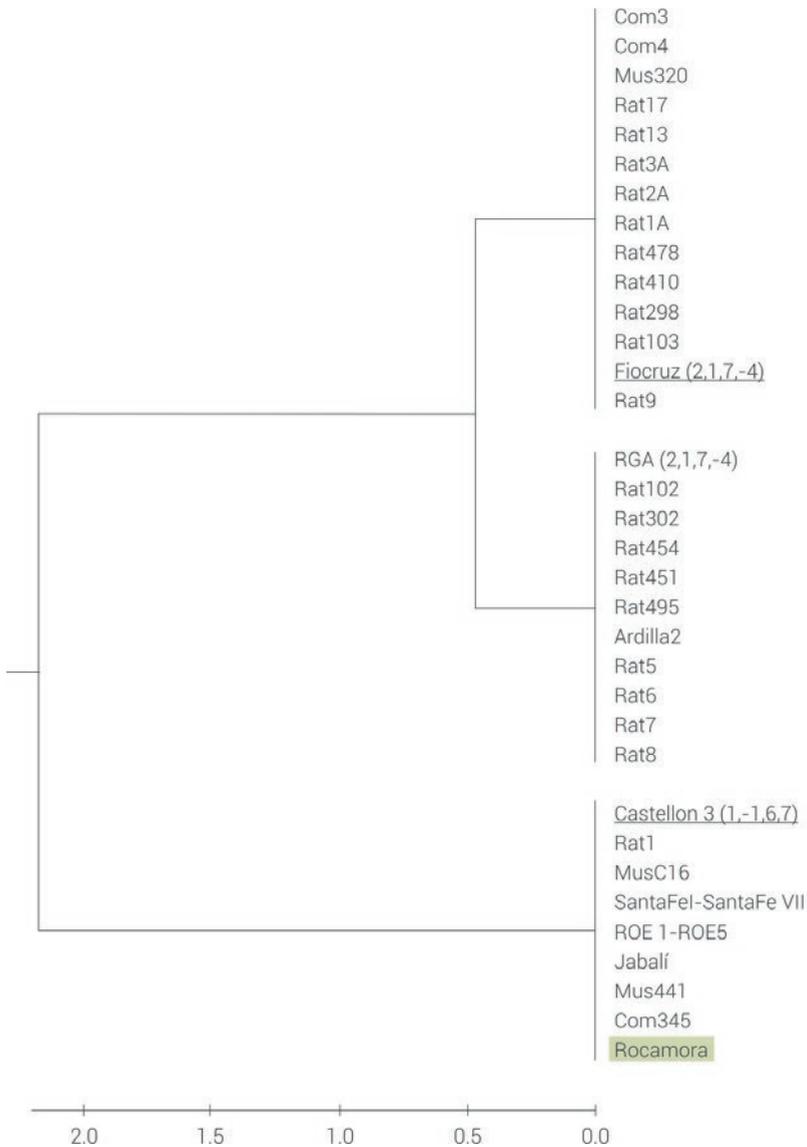


Figura 16. Árbol creado por UPGMA de los genotipos representados por las especies *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 y serovar Icterohaemorrhagiae RGA. Las cepas provenientes de animales de producción se encuentran resaltadas por color verde. Las cepas de referencia se encuentran subrayadas y se presenta entre paréntesis, el número de repeticiones de los VNTRs: 4bis, 7bis, 10bis, Lb4 y Lb5.

En la Figura 16 se muestra el árbol realizado a partir de los genotipos tipificados mediante el set de primers compuesto por cinco cebadores para flanquear los loci VNTR 4bis, 7bis, 10bis, Lb4 y Lb5 (Salaün y col., 2006). Se observa en la parte superior del árbol un grupo numeroso de genotipos representando por *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni Fiocruz L130 y serovar Icterohaemorrhagiae RGA, los cuales solo se pueden discriminar flanqueando estos 5 VNTRs. Trece cepas aisladas corresponden al genotipo Copenhageni Fiocruz L130, compuesto principalmente por cepas provenientes de ratas, una cepa aislada de ratón (Mus320) y dos comadrejas (Com 3 y Com 4), estas cepas son todas de la provincia de Buenos Aires. El segundo grupo representa el genotipo Icterohaemorrhagiae RGA y está compuesto por 11 cepas, de las cuales una fue aislada a partir de un riñón de ardilla y las restantes de ratas. En la parte inferior se encuentran las cepas tipificadas con el genotipo de *L. borgpetersenii* serogrupo Ballum serovar Castellonis Castellon 3, representado por 20 cepas, principalmente aisladas a partir de riñones de ratones (Santa Fe I a Santa Fe VIII, MusC16, Mus 441), Ratas (Roe 1 a ROE 5), una cepa aislada de un feto de jabalí y una aislada de un ovino (Rocamora).

Secuenciación de cepas con genotipo sin determinar mediante MLVA

El MLVA es una herramienta de genotipificación eficiente cuando los genotipos se encuentran previamente establecidos mediante el perfil de las cepas referenciales, en el caso de encontrar un perfil no comparable se debe utilizar otra técnica de caracterización molecular, como, por ejemplo: MLST, 16S rARN o gen *secY*.

En esta sección se incluyeron tres cepas aisladas de animales silvestres cuyo perfil no coincide con genotipos previamente tipificados por la técnica de MLVA. Estas cepas son Cuis y Peludo. Se secuencian las amplificaciones logradas de los loci flanqueados y los correspondientes de la cepa de referencia para poder corroborar las repeticiones obtenidas.

Se secuenció el VNTR 4 de la cepa del cuis y el VNTR 7 de la cepa del peludo conjuntamente con los mismos loci de la cepa de referencia

L. interrogans Pyrogenes Salinem, por ser más cercana al número de repeticiones obtenidos.

Los resultados de la secuenciación se analizan utilizando el programa BioEdit y DNABaser. La secuencia obtenida es limpiada eliminando los primers manualmente. Se utiliza el programa Tandem Repeats Finder (Benson y col., 1999) para confirmar las copias obtenidas en la corrida electroforética. A continuación, mostramos las secuencias procesadas con sus números de repeticiones (copias resaltadas con turquesa, azul, verde y rosa dependiendo del número de copias) obtenidas:

Secuencias procesadas

Cepa	Secuencia	Tamaño (pb)	Copias calculadas a partir de la corrida electroforética	Copias verificadas por Tandem repeats finder
Cuis	VNTR 4 bis	500	3	3,7
Peludo	VNTR 7	618	10	10,6
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Salinem	VNTR 4	240	3	3
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Salinem	VNTR 7	214	0	0

La comparación realizada del número de copias obtenido por dos métodos distintos nos brinda información sobre la identidad del genotipo con respecto a la cepa de referencia presente en el país. En el caso de la cepa Cuis VNTR4, las repeticiones coinciden con las obtenidas de la cepa de referencia *L. interrogans* serogrupo Pyrogenes serovar Pyrogenes Salinem (3 copias en ambas). En el caso de la cepa Peludo VNTR 7 en comparación con las repeticiones de la cepa de referencia encontramos una diferencia de 10 copias.

Luego, se realizó la búsqueda de las secuencias por Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), en la cual se alinea la secuencia en estudio (query) con aquellas depositadas en la base de datos GenBank. Mediante esta búsqueda se obtienen los valores de max score, total score, query cover, E-value y Max. Ident, los cuales permiten identificar la secuencia más idéntica a la de en estudio.

Este paso se realizó con las tres secuencias en estudio recopilando la misma información. A partir de la información obtenida solo se pudo confirmar y verificar la especie a la cual corresponden estas secuencias, estando en concordancia con los datos obtenidos por el perfil obtenido por MLVA. Estas cepas (Cuis y Peludo) son genotipos nuevos y no son similares a las repeticiones de las cepas de referencia mundiales utilizadas en los trabajos de Salaün y col. (2006) y Majed y col. (2005).

Análisis de coordenadas principales (PCoA)

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se basa en algoritmos estadísticos que permiten analizar los genotipos determinados sobre similitud y cercanía. El programa utilizado es el mismo con que anteriormente elaboramos matrices de distancias (Gen ALEx 6.0). El análisis de coordenadas principales parte del supuesto que no existe relación entre los datos reflejados en el eje X y el eje Y. De haber relación, esta puede ser positiva o negativa.



Figura 17. PCoA de los genotipos tipificados de *L. interrogans* mediante la utilización del set de siete cebadores para flanquear los loci: 4,7,9,10,19,23 y 31. Las cepas aisladas de animales de producción están en rojo y las de animales silvestres en negro, se resaltan en negrita los genotipos nuevos. Las referenciales se encuentran subrayadas. Los puntos verdes representan un genotipo.

Por un lado, en la Figura 17 se observa que el genotipo *L. interrogans* serovar Pomona se encuentra en el cuadrante superior derecho, muy distante de los genotipos serovar Canicola Hond Utrecht IV y serovar Portlandvere MY 1039 (cuadrante inferior izquierdo) y de la cepa Zorro y *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae y serovar Copenhageni representado por "Ictero" (cuadrante inferior derecho), pero cercano al genotipo del serovar Pyrogenes. Los genotipos Hond Utrecht IV y MY 1039 se encuentran cercanos y en el mismo cuadrante, esto afirma la similitud entre sí, dado que pertenecen al mismo serogrupo.

Por otro lado, en el cuadrante inferior derecho podemos encontrar el genotipo "Ictero" y el de la cepa Zorro, los cuales son cercanos entre sí génicamente, pero a su vez distantes de Pomona, Muellieri, Pyrogenes y los genotipos de Canicola. El genotipo de la cepa Zorro es un genotipo similar a "Ictero", igualmente ocurre con el genotipo de la cepa Rat-BA el cual es similar al genotipo de Grippothyphosa serovar Muellieri RM2. Los genotipos nuevos provenientes de las cepas Cuis y Peludo se encuentran relacionados con el genotipo de Pyrogenes. En color rojo se encuentran los genotipos aislados de animales de producción, y se observa su coincidencia con los aislamientos provenientes de animales silvestres, como es el caso de los genotipos: Hond Utrecht IV, MY 1039 e Icterohaemorrhagiae. Este análisis demuestra visualmente las distancias génicas y variabilidades entre los genotipos encontrados en este estudio.

En el análisis de PCoA que se muestra en la Figura 18, se analizaron dos especies de leptospiras patógenas, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*. *L. borgpetersenii* representada por el genotipo de la cepa referencial Ballum serovar Castellonis Castellon 3, la cual se encuentra en el cuadrante inferior derecho muy distante de los genotipos encontrados de *L. interrogans*. En este análisis se destaca la variabilidad génica que presentan los genotipos representados en el clado de Icterohaemorrhagiae, ya que no se encuentran en el mismo cuadrante. En el cuadrante superior izquierdo se encuentra el genotipo RGA y en el cuadrante inferior izquierdo el genotipo Fiocruz. Cercano a RGA se encuentra el genotipo de Muellieri RM2, el cual pertenece al serogrupo Grippothyphosa y se encuentra relacionado con el genotipo RatBA. En este PCoA, donde se muestran los tres genotipos nuevos, se puede ver

la relación de las cepas Cuis y Peludo con el serogrupo Pyrogenes. Este análisis también refuerza la afirmación de que existe una alta variabilidad entre genotipos.



Figura 18. PCoA de los genotipos tipificados de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* mediante la utilización del set de cinco cebadores para flanquear los loci: 4bis, 7bis, 10bis, Lb4 y Lb5. Las cepas aisladas de animales de producción están en rojo y las de animales silvestres en negro, se resaltan en negrita los genotipos nuevos. Las cepas referenciales se encuentran subrayadas. Los puntos verdes representan un genotipo.

Interpretación de los resultados obtenidos por el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Al comparar ambos PCoA (Figuras 17 y 18) se observan relaciones similares entre ambos análisis considerando que se están flanqueando distintos sets de loci. Esto refleja la veracidad de la técnica en cuanto a precisión de la caracterización de un genotipo. Existe un patrón similar entre los genotipos nuevos en ambos análisis. Los genotipos provenientes de las cepas Cuis y Peludo efectivamente se encuentran relacionados con Pyrogenes, pero son distintos entre sí, en ambos aná-

lisis se encuentran en los cuadrantes superiores, lejos de los demás genotipos. En el caso de RatBA que representa un nuevo genotipo circulante en el país podemos ver su cercanía con la cepa referencial *L. interrogans* serovar Muelleri RM2 que a su vez se encuentra cercano al grupo de las Icterohaemorrhagiae. Además, otro resultado que llama la atención al realizar este análisis es la distancia que representaron los genotipos del clado Icterohaemorrhagiae Fiocruz L1-130 y RGA en la Figura 18, ya que al comparar los códigos de estos dos genotipos podemos encontrar una diferencia en las repeticiones obtenidas en el locus VNTR Lb5, en las cuales para Fiocruz existen 4 copias y en RGA 6 copias. La comparación de los códigos de los genotipos introducidos en este análisis con su ubicación en el PCoA, nos brinda información adicional de relevancia en cuanto a su variabilidad génica.

Existen más trabajos sobre el PCoA aplicado a genotipos determinados por MLVA: Grune Loffler y col. (2016 y 2017).



CAPÍTULO III

Aplicaciones
del diagnóstico molecular



Desde la incorporación de técnicas diagnósticas moleculares se está buscando a nivel mundial un diagnóstico rápido, sencillo de interpretar, sensible y de detección temprana, es decir, en fase inicial o aguda (presencia de ADN de leptospiras patógenas) para poder iniciar la antibioticoterapia de manera certera y discriminar entre otras enfermedades abortivas en animales de producción como brucelosis y enfermedades renales como es el caso de los caninos.

La dificultad de la utilización de la técnica de PCR es la accesibilidad que puedan o no tener los laboratorios de diagnóstico (de baja y mediana complejidad), ya que para poder realizarla se requieren equipos especiales como termocicladores, cuba de electroforesis y fuente de poder. Otra de las dificultades para el diagnóstico es el método de extracción para lograr templados de ADN de calidad a partir de muestras clínicas. Las muestras clínicas para el diagnóstico de leptospirosis animal son: suero, sangre, orina, riñón, bazo, hígado, pulmón y en algunos casos humor acuoso. En muchos trabajos se utiliza un kit comercial de extracción y purificación. Hemos realizado ensayos sobre la comparación de la eficiencia de diversos métodos de extracción y purificación a partir de muestras clínicas. Se han observado resultados prometedores utilizando el protocolo de la resina Chelex-100 (detallado en el capítulo II y VI).

Existe una alta gama de primers empleados para el diagnóstico de leptospiras patógenas en muestras clínicas, algunos de los genes utilizados son: 5S, 16S, 23S, gryB, flaB, LipL32, secY, lig. Los sets de primers son: A-B, G1-G2, B64I-II, UP1TL-UP2rTL, LgyrF-LgyrR, LepF1-LepR1, PU1, SU1, lig FRET-PCR forward- lig FRET-PCR reverse, respectivamente (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Comparación de técnicas de diagnóstico por PCR utilizadas en muestras clínicas animales. (Modificado de Hamer y col., 2019).

Tipo de muestra clínica	Método de extracción utilizado	PCR	Ventaja	Desventaja	Referencia
Semen y fluido vaginal de caprinos y ovinos	Fenol/Tiocianato de guanidinio	PCR – 16S rRNA	Más rápido y simple que el cultivo. No requiere bacterias viables en la muestra.	Posible contaminación con orina en la toma de muestra.	Lilenbaum y col., 2008
Orina de caninos	Qiagen mini kit y Qiagen Vacuum Manifold	RT-PCR-lipL32	Sensible, rápida y presentó una eficiencia del 98,5 %.	No discrimina entre serovares. Técnica no validada.	Rojas y col., 2010
Suero canino (<i>Ensayo controlado</i>)	QIAmp DNA extraction kit (Qiagen, Germany)	PCR real time - secY	Resultados más rápidos que la convencional. Menos probabilidad de contaminación.	Equipamiento adicional a la convencional.	Ahmed y col., 2012
Orina bovina Hígado/riñon de hamsters (<i>Ensayo controlado</i>)	QIAamp DNA mini kit (Qiagen, CAT 51304) Hervido de muestra	PCR - 23S rADN para leptospiras patógenas o 23S rARN saprófitas	Los primers diferencian leptospiras patógenas de las saprófitas, mayor rendimiento frente a cultivo. Kit comercial tiene mayor sensibilidad que hervido.	Autólisis tisular afecta a la leptospiras, por lo que se debe analizar la muestra inmediatamente.	Boggia, 2013
Orina de equinos, bovinos, caprinos, porcinos	Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega, Madison, EUA)	PCR -lipL32	Específico para leptospiras patógenas. No hay entrecruzamiento con otras bacterias.	Posibles falsos negativos por eliminación intermitente en orina. Requiere el uso de diuréticos.	Hammond y col., 2014
Sangre entera/ orina de caninos	High-Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)	FRET-PCR –genes lig	Más sensible y menos falsos positivos que PCR real time.	Solo detecta patógenas. Técnica no validada.	Xu y col., 2014
Suero canino	Chelex-100 (BioRad)	LAMP (loop-mediated isothermal amplification) - 16S rRNA	Menor costo y equipamiento que PCR. Detección de amplificación fácil y rápida.	Técnica no validada.	Grune Loeffler y col., 2016

En Haake y Levett (2015) se expone que la limitación del diagnóstico basado en PCR para leptospirosis no logra determinar el serovar infectante; por lo que se considera que esto es relevante epidemiológicamente y en salud pública. Se manifiesta que las leptospiras deben ser aisladas para poder confirmar la presencia de estas en una región o país particular (serovar circulante). Para poder determinar el serovar se debe aislar la leptospira y caracterizar molecularmente, se detallan las herramientas de caracterización molecular en el capítulo IV.

En una revisión reciente sobre herramientas de diagnóstico molecular de leptospirosis animal (Nogueira Di Azevedo y Lilenbaum, 2020) se

resumen en una tabla los genes y las técnicas de PCR aplicados en diferentes grupos animales (bovinos, felinos, caninos, equinos, caprinos y porcinos) utilizados en la región.

Tabla 4. Comparación de técnicas de diagnóstico por PCR utilizadas en muestras clínicas humanas (1992-2020).

Tipo de muestra clínica	Método de extracción utilizado	PCR	Conclusiones	Referencia
Orina, sangre, líquido cefalorraquídeo	Protocolo de extracción (Brenner y col., 1982)	PCR <i>rrs</i> (16S rARN), primers (A, B, C y D)	Se detectaron muestras PCR positivas en orina y líquido cefalorraquídeo.	Merien y col., 1992
Suero y orina	Protocolo de extracción (Broom y col., 1990)	PCR amplificando los genes <i>secY</i> y <i>flaB</i> , primers G1/G2 y B64II/B64II	Las muestras de orina presentaron mayor positividad por PCR.	Bal y col., 1994
Sangre	QIAamp DNA mini kit	Nested PCR amplificando el gen 23S rARN, primers LepF1, LepR1, PUI, SUI	En este trabajo también se utilizaron riñones de rata. Se encontró mayor positividad por PCR en las muestras de riñones sobre las muestras de sangre de pacientes. Esta PCR discrimina entre especies patógenas de saprófitas.	Kositantont y col., 2007
Suero y gotas de sangre (papel Whatman) de pacientes con síntomas febriles	QIAamp DNA Mini Kit (muestras de suero), Protocolo de extracción utilizando papel Whatman (gotas de sangre). Para la extracción de ADN a partir de las muestras de riñones de rata se utilizó un protocolo <i>in house</i>	RT-PCR gen <i>rrs</i> 16S rARN. Primers: AB y CD. Los amplicones fueron secuenciados. Se diseñó un primer R inter para amplificar especies leptospiras intermedias	También se incluyeron muestras animales de la zona en estudio (orina y riñones de ratas). Se determinó 96 % de presencia de leptospiras intermedias (<i>L. wolffii</i> y <i>L. inadai</i>) en las muestras de pacientes.	Chiriboga y col., 2015
Sangre y orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de leptospirosis	Protocolo con buffer de lisis (Exner y col., 2003)	RT-PCR y PCR <i>lipL32</i>	Se analizaron un total de 400 muestras aplicando PCR, MAT y el aislamiento. No se obtuvieron aislamientos de las muestras.	Podgorsek y col., 2020

Existen en la actualidad inmunocromatografías de flujo lateral (ICF) para el diagnóstico de leptospirosis en el mercado internacional "Dip-S-Ticks®-IgM" (comercializado por la agencia PanBio INDX, Inc) y "LEPTO Dipstick", Lepto Tek que detectan de forma rápida anticuerpos IgM o IgG en humanos y en caninos respectivamente (Obregón y col., 2011). A nivel nacional no existe la comercialización de estas versiones ya que son costosas de importar y costosas de producir a nivel local. Otra desventaja es que estas pruebas son serogrupo específicas y no

están diseñadas para detectar todos los serogrupos y serovares presentes en los distintos entornos y ambientes del mundo.

La necesidad de la elaboración de un kit diagnóstico para leptospirosis a partir de la detección del ADN del agente es primordial para el diagnóstico en la fase inicial de esta enfermedad, ya que de esta manera no solo se puede iniciar la antibioticoterapia tempranamente y evitar casos fatales, sino también prevenir brotes epidemiológicos en sanidad animal y salud pública.

A nivel internacional existen algunos kits, la mayoría detecta anticuerpos contra leptospiras (IgM ELISA kit (Cortz Diagnostics); Strip *Leptospira* RAPID (ImmuneMed); RAPID *Leptospira* Ab test kit (Bionote), ELISA para caninos (Bionote), Lepto Latex Test, Bovine *Leptospira* IgG (Lep IgG) ELISA Kit (Biocompare) y PrioCHECK® *Leptospira* Hardjo Antibody ELISA kit, strip para bovinos (ThermoFisher). El kit Bacto Real Kit *Leptospira*- PCR-RT detecta leptospiras patógenas e intermedias (Eurovet Veterinaria).

Surge la necesidad del desarrollo de un kit de diagnóstico selectivo y de detección temprana (en fase inicial) para la leptospirosis, ya que en el mercado nacional no existe un kit de diagnóstico para leptospirosis animal y tampoco humana. Se realiza el diagnóstico utilizando el test de microaglutinación (MAT). La necesidad de la toma de muestra igualmente sigue siendo primordial para el aislamiento del agente para así poder caracterizarlo posteriormente.

Para el caso de leptospirosis, la técnica de referencia es el test de microaglutinación (MAT), la cual no es llevada a cabo por todos los laboratorios, sino por aquellos que mantienen un cepario con la cantidad de serovares regionales de *Leptospira* spp. vivas y personal específicamente entrenado para interpretar los resultados en el microscopio de fondo oscuro. La MAT cuantifica anticuerpos presentes en el suero de los animales. Las muestras más frecuentemente analizadas son sueros de vacas abortadas y de un número de vacas no-abortadas del mismo lote, para estimar en forma indirecta el rol de leptospiras patógenas en el evento del aborto. Para la correcta interpretación de los resultados se requiere, además, de una segunda muestra extraída 15 días después, la cual pocas veces es obtenida (dado que la leptospirosis es una

enfermedad bifásica, ver capítulo I). En tales condiciones, es frecuente que no se logre arribar a un diagnóstico preciso de la enfermedad. Este último punto es relevante cuando se realiza la validación de una herramienta diagnóstica molecular, ya que se deben elaborar paneles de sueros seleccionados con la titulación de MAT obtenida en títulos negativos, bajos (1/200), medios (1/800) y altos (mayor a 1/3200), para luego realizar las extracciones de ADN y amplificar por al menos 2 técnicas de PCR.



CAPÍTULO IV

Estudios genómicos



Los estudios genómicos sobre el género *Leptospira* spp. han demostrado muchos avances los últimos años, como es la reclasificación taxonómica de 3 clados (especies patógenas, intermedias y saprófitas) en 2 clados principales (especies patógenas y saprófitas) con 2 subclados (Vicent y col., 2019), organizados según el criterio de divergencia y afinidad génica respecto a la presencia de genes de virulencia en las diferentes especies descritas en la actualidad. De 21 especies reportadas en el 2009 (Cerqueira y Picardeau, 2009) (Figura 19), en la actualidad se reportan 64 (Vicent y col., 2019) (Figura 20). No solo se ha aportado en la taxonomía de este género, sino también se han desubierto procesos metabólicos únicos en este género bacteriano.

Estudios recientes sobre genómica de *Leptospira* spp. han encontrado resultados importantes con respecto a la patogenicidad de las cepas patógenas y las características particulares de sobrevivencia en el medioambiente y la posibilidad de crear biofilms de las especies saprófitas de *Leptospira* spp. En el estudio comparativo sobre tres genomas realizado por Picardeau y col. (2008) se determinó que los genes compartidos entre las tres especies (*L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*) son consistentes con un origen común (antecesor) para las leptospiras patógenas y saprófitas. Los genes conservados a lo largo de las tres especies se encuentran distribuidos en los dos cromosomas existentes en las tres especies y se determinó que existen 2052 genes que comparten estas especies. La especie con menos genes no identificados es *L. borgpetersenii*, esto se puede deber a que presenta un genoma significativamente más corto que las otras especies.

Análisis basados en secuencias del gen 16S rARN han indicado que las espiroquetas son un grupo ancestral de bacterias evolucionadas a partir de un ancestro común de protoespiroquetas (Paster y col., 1991). En la Figura 19, se muestra el árbol filogenético basado en el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rRNA mostrando las especies de *Leptospira* spp. existentes (Cerqueira y Picardeau, 2009).

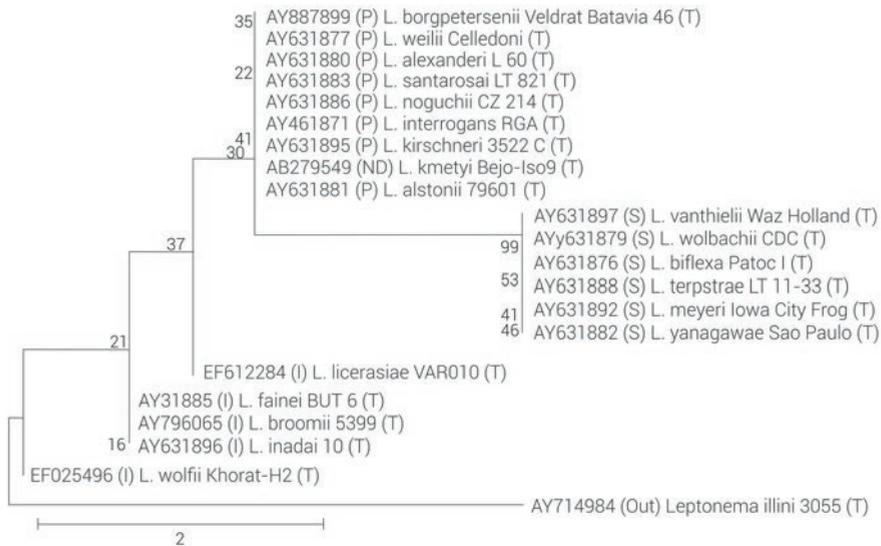


Figura 19. Árbol filogenético basado en el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rARN mostrando las especies de *Leptospira* spp. (Fuente: Cerqueira y Picardeau, 2009).

Podemos observar en la Figura 19 tres clados representando las especies patógenas (P), saprófitas (S) e intermedias (I). Dentro de las especies patógenas existe una especie no determinada (ND) *L. kmetyi*. La patogenicidad de las especies intermedias sigue estando en debate. Se inocularon hámsteres con *L. inadai* y *L. licerasiae*, ambas aisladas de pacientes humanos, sin embargo, en los ensayos de inoculación en el modelo murino por excelencia para estudiar leptospirosis (hámsteres) no presentaron signos clínicos característicos de una infección por leptospirosis patógenas. Las especies *L. fainei* y *L. broomii* también han sido aisladas de humanos y la virulencia de estas tampoco ha sido comprobada en la actualidad. Las cepas patógenas de *Leptospira* spp. han ampliado su diversidad en respuesta a cambios en la ecología de sus hospederos mamíferos. Sin embargo, la transferencia horizontal génica entre especies de *Leptospira* spp. dificulta la construcción de árboles filogenéticos a nivel de especie considerando las secuencias genómicas enteras (Ralph y McClelland, 1994; Haake y col., 2004; Cerqueira y Picardeau, 2009; Picardeau y col., 2008).

Se han usado otros genes para discriminar entre especies de leptospirosis, estos incluyen: *rpoB* (La Scola y col., 2006), *gyrB* (Slack y col., 2006), *ligB* (Cerqueira y col., 2009) y recientemente *ppk* (Vincent y col., 2019) (Figura 20).

ppk

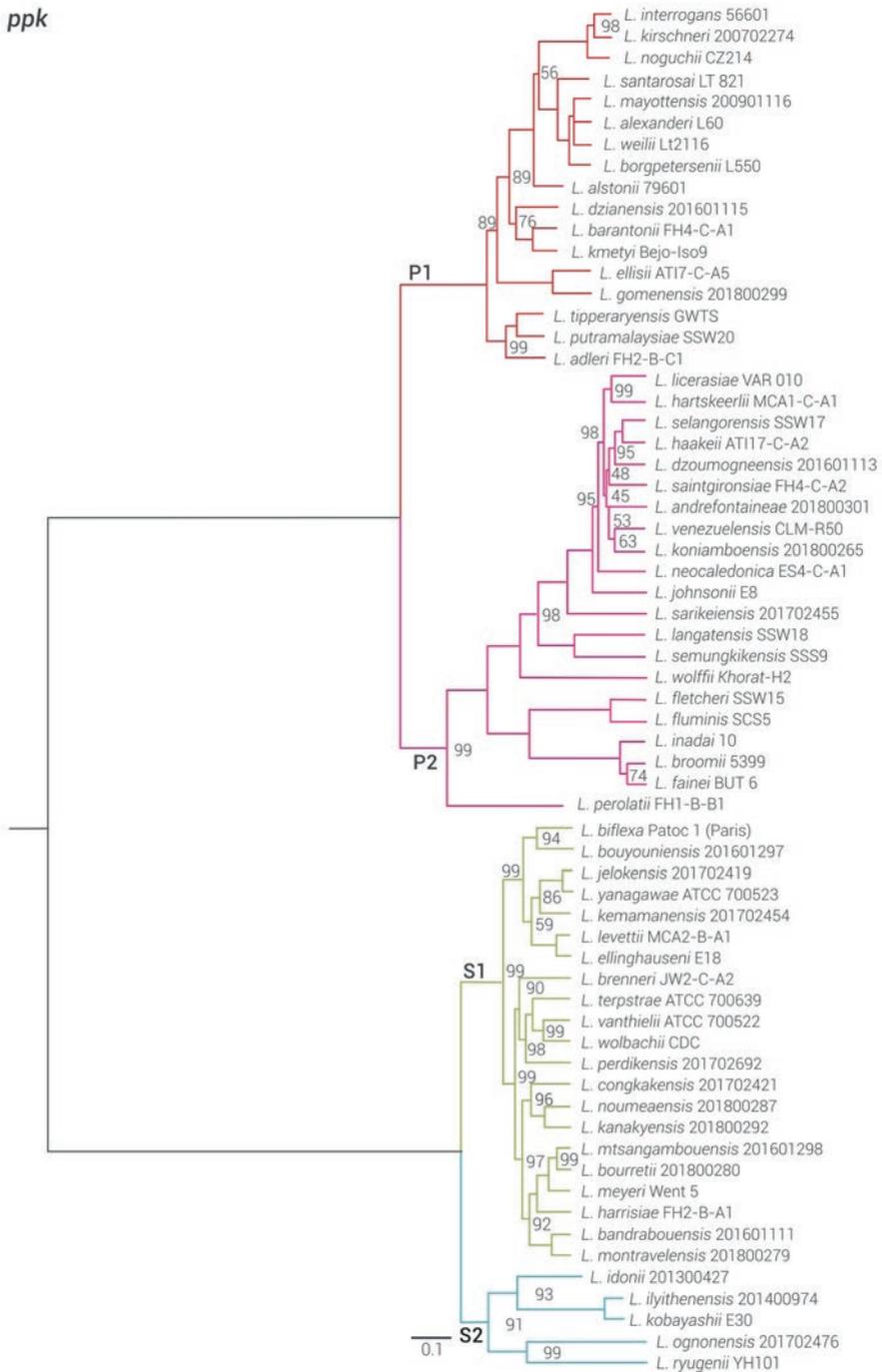


Figura 20. Árbol filogenético utilizando el gen 16S rARN y secuencias *ppk* para evaluar la diversidad génica presente en el género *Leptospira* spp. Subclados: P1 rojo, P2 violeta, S1 verde y S2 azul (P: especies patógenas, S: saprofitas o biflexas). (Fuente: Vicent y col., 2019).

Se ha observado que las filogenias construidas considerando únicamente secuencias del gen 16S rARN no serían lo suficientemente robustas para poder discriminar entre la variedad de especies descritas en la actualidad, por ende, se están realizando análisis filogenéticos basados en secuencias de dos genes o más. La reconstrucción basada en el gen 16S rARN es usada ampliamente para poder establecer relaciones entre especies bacterianas, sin embargo, la alta conservación de este gen reduce su poder discriminatorio y las secuencias 16 S rARN pueden no ser suficientes para discriminar entre especies. En Vicent y col. (2019) se encontró que las especies: *L. johnsonii*, *L. saintgironsiae* y *L. neocaledonica*; *L. langatensis* y *L. sarikeiensis*; *L. haakeii* y *L. selangorensis*; *L. venezuelensis* y *L. andrefontaineae*; *L. congkakensis*, *L. mtsangambouensis* y *L. noumeaensis*; *L. ellinghausenii* y *L. montravelensis*; *L. kemamanensis* y *L. bouyouniensis* son 100 % idénticas en sus secuencias 16S rARN.

Se utilizaron estas secuencias y otras disponibles en Genbank para descubrir la separación entre los subclados P1, P2, S1, S2. Sin embargo, no es un análisis filogenético absoluto, ya que presenta menos resolución al incluir un gen no dominante (ppk). La filogenia para el género *Leptospira* spp. presenta un dinamismo particular, ya que se siguen aislando y descubriendo nuevas especies, lo que refleja la necesidad de tener un consenso y criterio común a nivel global molecular y taxonómicamente para definir patrones claros de la pertenencia de las especies potencialmente "nuevas" relacionados con la sintomatología y el origen del aislamiento. Es importante, en este punto, aportar cepas aisladas recientemente para poder lograr este objetivo.

Se han realizado muchos estudios sobre los genomas de leptospiras en los últimos años (Tabla 5), estos han mostrado características únicas sobre este género bacteriano, como es el desarrollo de un sistema mutagénico que influencia su patogénesis (Adler, 2015).

En una revisión (Lehman y col., 2014) sobre patogenómica de leptospiras se observó que existen islas de patogenicidad (algunas comunes en las especies patógenas y otras en las intermedias) que parecen estar influenciadas por mecanismos regulatorios propios de cada *Leptospira* spp., también los factores ambientales en los cuales se encuentra (tubos contorneados renales de un reservorio, en el barro, en el agua, en el torrente sanguíneo, en medio de cultivo) parecen tener un efecto positi-

vo o negativo en esta regulación o activación de distintos mecanismos de supervivencia. Existen transposones a lo largo del genoma que regulan la expresión de distintos genes. Muchos de los cuales aún no están descritos (CDCs) y cuya función no ha podido ser comprobada *in vitro*.

Se encontraron más de 200 genes que codifican para proteínas de transducción de señales en cada genoma de *Lepstospira* sp. analizado (Base de datos de señales de trasduccion-MiSTDB2 (Ulrich y Zhulin., 2010), esto sugiere que el género *Leptospira* spp. es capaz de responder a una gran variedad de señales ambientales (Picardeau, 2015).

En Murray y col. (2009) se desarrolló un ensayo para determinar genes mutantes utilizando la metodología de Himar1, sistema de transposones comúnmente presentes en bacterias. En este ensayo, por un lado, se obtuvieron 929 transposones independientes y se determinó la ubicación de las inserciones en *L. interrogans*. Se descubrieron 25 mutantes de transposones que presentaron inserciones en los genes 16S rARN o 23S rARN las que indican que estos genes son puntos clave para la inserción dentro del genoma de *L. interrogans*. Por otro lado, también se encontraron loci que contienen genes esenciales en la biosíntesis de lipopolisacáridos, los cuales mostraron pocos lugares de inserciones de transposones. Se encontraron dos mutantes atenuados en genes hipotéticos, esto fortalece la teoría que la mutagénesis de transposones es importante para la identificación de factores de virulencia nuevos en *L. interrogans*.

Para la caracterización de los genes presentes en leptospiras patógenas el uso de las librerías de transposones ha sido crucial. Esta tecnología es compleja, ya que requiere del clonado extracromosomal mediante vectores y no ha sido desarrollada del todo para el estudio en leptospiras. Sin embargo, dos laboratorios diferentes en simultáneo y a lo largo de tres años han trabajado sobre la eficiencia en sistemas de transformación generando una librería de 1.000 mutantes distintos de *L. interrogans* (Murray y col., 2009). Se han identificado 721 mutaciones que afectan las regiones codificantes de proteínas de 551 genes diferentes. Se estima que el 18 % de genes no esenciales de *L. interrogans* han sido inactivados a través de la mutagénesis de transposones. Se citan a continuación algunos mutantes analizadas para esta especie: lipL41 (King y col.,2013), htpX (Henry y col., 2013), katE (Eshghi y col.,

2012a), flaA1 y flaA2 (Lambert y col., 2012), clpB (Lourdault y col., 2011), hemO (Murray y col., 2008), lipL32 (Murray y col., 2009), lruA (Zhang y col., 2013), htpG (King y col., 2014) y perR (Lo y col., 2010).

Para poder verificar los factores de virulencia en leptospiras determinados por comparación genómica *in silico* se pueden utilizar diversos paquetes informáticos que ayudan en el análisis proteómico y bioinformático, como pueden ser: AMIGene, la plataforma de anotación MaGe, SprioScope (base de datos pública, disponible en <http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>) y la plataforma interactiva de Wasabi.

Algunas veces, en los análisis bioinformáticos comparativos de genomas, no se consideran las regiones cercanas genómicas de genes ortólogos, estas podrían ser importantes para la regulación génica bacteriana, coordinada a través de la transcripción-transducción de operones y puede dar nuevos conocimientos sobre cómo los genes se adquieren y se propagan. Por último, ninguno de estos programas detecta los genes dentro de un marco de cambio de lectura, que podrían representar genes prescindibles o errores de secuenciación. Para abordar estos problemas, se desarrolló la herramienta Clustering Ortholog pangenoma (PanOCT). PanOCT es una herramienta basada en el gráfico escrito en Perl que utiliza la relación de la puntuación de BLAST (BSR) conservada en regiones cercanas a genes (CGN) y la detección del desplazamiento del cuadro en un sistema de puntuación ponderado de generar grupos de genes no parálogos y ortólogos de varios genomas. PanOCT fue utilizado en una publicación sobre patogenómica de *L. interrogans* (Lehman y col., 2013).

En Lehman y col. (2014) se detalla que, debido al intercambio genético con otros elementos móviles, Phage Finder también puede identificar Islas Genómicas (IG) y plásmidos integrados. Además de la identificación del fago y las IGs, Phage Finder puede clasificar las regiones sobre la base de homología con fagos específicos de familias de proteínas. Otras herramientas computacionales han sido desarrolladas para predecir las IGs, ya sea, por el sesgo de composición de las secuencias o a través de un análisis comparativo de los genomas en estudio. Una de estas herramientas, IslandViewer, es una aplicación web accesible que predice las IG a través de secuencias subidas a la web, el resultado del análisis de este programa es la combinación de varios métodos de predicción desarrollados de forma independiente: IslandPick, Islan-

dPath-DIMOB y SIGI-HMM. Mientras la mayoría de las herramientas de predicción de IG utilizan bien un sesgo o composición de la secuencia genómica comparativa, IslandViewer integra ambos enfoques, lo que resulta en una mayor sensibilidad y especificidad del análisis. Los datos pueden ser recuperados, tanto a nivel de cromosomas o génico, como un método específico coherente de predicción de IG.

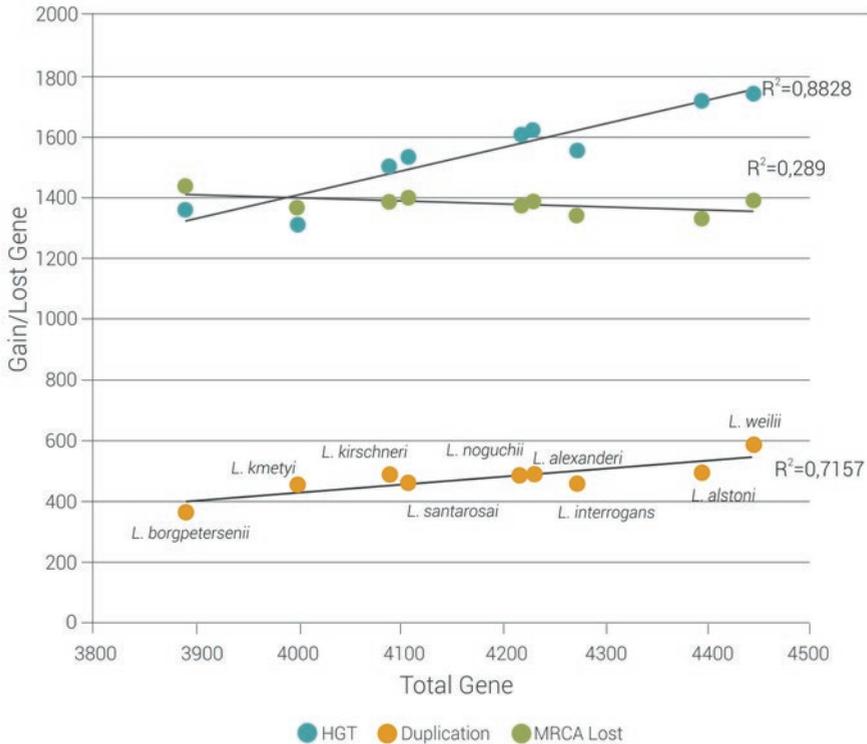


Figura 21. Diagrama sobre el rol de la transferencia horizontal de genes, pérdida de genes y duplicación de genes en las especies patógenas de *Leptospira* spp. (*borgpetersenii*, *kmetyi*, *kirschneri*, *santarosai*, *noguchii*, *alexanderi*, *interrogans*, *alstoni* y *weilii*). En azul se encuentran los genes adquiridos por mecanismos de transferencia horizontal; en verde, los loci perdidos; y en naranja, los genes adquiridos por duplicación. (Fuente: Xu y col., 2016).

Las bacterias pueden adquirir genes en sus genomas a través de la transferencia horizontal o duplicación de estos a partir de otros microorganismos. Estos mecanismos se encuentran ampliamente descritos para diversos grupos bacterianos. En el género de *Leptospira*

ra spp. se ha estudiado con más profundidad en cepas patógenas, las cuales han adquirido genes de virulencia a través del mecanismo de transferencia horizontal por sobre la duplicación de genes. En Xu y col. (2016) se analizaron nueve genes conservados de especies leptospiras patógenas (1.438) conservaron 1.023 genes del más reciente antecesor (MRCA por sus siglas en inglés, Most Recent Common Ancestor) mientras que adquirieron un total de 415 genes nuevos, representando el 28,8 % (Figura 21). Luego de la diversificación de especies o en el proceso divergente del establecimiento en cepas entre 1.705-2.202 genes fueron adquiridos y un promedio de 1.383 genes se han perdido, lo cual podría implicar o ser consecuencia de la adaptación biológica/evolutiva al hospedero. En el análisis filogenético realizado en este estudio se muestra que 218 nuevos genes fueron adquiridos en el linaje del MRCA dentro del grupo de las especies intermedias y patógenas. En este trabajo no se pudieron describir las funciones de los genes "nuevos". Sin embargo, se resaltó que, 16 genes asociados con factores de virulencia fueron adquiridos. La conclusión principal fue que se adquieren más genes relacionados con la virulencia que los que se pierden por mecanismos génicos, lo que indica posiblemente un rasgo evolutivo conservado dentro del género *Leptospira* spp.

Tabla 5. Comparación de los estudios genómicos del género *Leptospira* spp. en orden (2004-2020), se indican la cantidad de genomas secuenciados, análisis filogenéticos, la base de datos en la cual se depositaron los datos y las conclusiones o descubrimientos de cada trabajo.

Genomas secuenciados	Análisis filogenéticos	Base de datos	Conclusiones/ descubrimientos	Referencia
N=1	Se ensamblaron manualmente las secuencias 16S rDNA empleando ESEE 3.2. Para los análisis filogenéticos se elaboraron dos matrices (34 taxa y 1255 posiciones; 24 taxa y 1375 posiciones respectivamente) utilizando el programa PAUP 4.0b8 (Swofford DL, 2003). El tiempo de divergencia fue estimado basado en 1445 posiciones secuencias 16S rRNA (se asumió una tasa constante de 1 al 2 % durante 50 millones de años).	Genbank, números de acceso: AE016823 (chromosome I) and AE016824 (chromosome II).	El análisis de secuencias genómicas reveló la presencia de un competente sistema de transporte compuesto por 13 familias de genes que codifican para proteínas transportadoras mayores incluyendo un sistema "efflux" compuesto por 3 miembros, compatible con la supervivencia a largo plazo de esta cepa.	Nascimento y col., 2004

Genomas secuenciados	Análisis filogenéticos	Base de datos	Conclusiones/ descubrimientos	Referencia
N= 1	La filogenia fue llevada a cabo utilizando el gen 16S rARN como también MLST.	La anotación de genes fue realizada según indicado en (Louvel y col., 2006) utilizando la plataforma de anotación MaGe (Vallenet y col., 2006). Los datos se encuentran disponibles en la base de datos publica de SprioScope (http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage).	El genoma de <i>L. biflexa</i> presenta 3.590 genes que codifican para proteínas distribuidos a lo largo de replicones circulares, un cromosoma con 3.604 y un replicón más pequeño de 278 kp el cual también presenta genes esenciales y un tercer replicón de 74 kp. Análisis comparativos de las secuencias mostraron que <i>L. biflexa</i> es un modelo excelente para estudiar	Picardeau y col., 2008
N= 2	Se secuenciaron dos cepas de <i>Leptospira licerasiae</i> (cepas VAR010 y MMD0835). Se anotaron los genes (CDCs) y se trabajó sobre islas de patogenicidad. No se realizaron análisis filogenéticos.	Los genomas de <i>L. licerasiae</i> cepa VAR010T y MMD0835 fueron subidas a GenBank, con los números de acceso AH0001000000 y NZ_AFL000000000	En este estudio se encontró que mientras un cromosoma comparte homología con LE1 de <i>L. biflexa</i> , el segundo es homólogo a una región de <i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni y Lai aún no determinada. Se postula en este estudio que los genes compartidos con especies patógenas son consecuencia de la transferencia horizontal de genes. <i>L. licerasiae</i> esta más cercanamente relacionada con <i>L. interrogans</i> génicamente.	Ricaldi y col., 2012
N=1	Se realizó el alineamiento a través del sistema MAUVE. No se realizaron estudios filogenéticos, sí sobre las proteínas presentes en esta cepa. Se utilizó la base de datos de Pfam para poder determinar los dominios funcionales de proteínas hipotéticas.	Las secuencias del genoma completo de <i>L. santarosai</i> serovar Shermani cepa LT821 han sido depositadas en DDBJ/EMBL/GenBank bajo los números de acceso CP006694 (cromosoma I) y CP006695 (cromosoma II).	Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que las OMPs (Outer Membrane proteins) y las lipoproteínas pueden expresarse durante la infección por leptospirosis y facilitarían la invasión renal del hospedero.	Chou y col., 2014
N= 1	Se realizó un análisis filogenético utilizando MLST (http://pubmlst.org/leptospira/) asociado con el tipo ST52. Este perfil mostró correlación con el serogrupo Pomona. Se utilizó el ISFinder (Caimi y col., 2012) para predecir inserciones en genoma AKRFB (draft genome).	Los datos sobre este genoma secuenciado se encuentran en DDBJ/ENA/GenBank, número de acceso: LUHH00000000	Se encontraron varios genes de virulencia presentes en este genoma: lipL32, lipL41, ligA, y ligB.	Varni y col., 2016

Genomas secuenciados	Análisis filogenéticos	Base de datos	Conclusiones/ descubrimientos	Referencia
N= 102	El análisis comparativo de los genomas se realizó utilizando Mauve (Darling y col., 2004) y para el árbol filogenético se empleó PHYML (Guindon y Gascuel, 2003) concatenando genes ortólogos basados en secuencias proteicas en cada genoma.	Los datos crudos de los genomas completos secuenciados se encuentran depositados en DDBJ/EMBL/GenBank números de acceso: JQOL000000000-JQSB000000000. Las versiones descritas en este trabajo se encuentran bajo estos números de acceso: JQOL010000000-JQSB010000000	Se ha encontrado alta plasticidad genómica de alto nivel a través de la secuenciación del genoma entero de especies pertenecientes a este género en los últimos años. La función de la mayoría de estos genes (59 %) es desconocida reflejando mecanismos patogénicos únicos de este género. De hecho, la reducción en tamaño del genoma de <i>L. borgpetersenii</i> refleja un incremento en la dependencia del hospedero para lograr sobrevivir en condiciones ambientales fuera del hospedero.	Xu y col., 2016
N= 17	Los árboles filogenéticos del gen 16S rARN fueron elaborados por alineamientos múltiples utilizando la base de datos Ribosomal database Project (RDP-X) (Cole y col., 2009). Se elaboró otro análisis filogenético utilizando el gen secY empleando el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). Para ambos análisis se recortaron columnas con secuencias múltiples que tuvieran muchos espacios (gaps) analizándolos por Maximum-likelihood. Se realizó MLST con 7 genes housekeeping tomando 20 genomas como referencia, se asignaron los ST (Sequence Types) usando la página de MLST (http://leptospira.mlst.net/) (Boonsilp y col., 2013).	Las secuencias de los genomas fueron subidos a la base de datos del Genbank (y WGS Genome Master) bajo los siguientes números de acceso: AHMT000000000.2 AOHD000000000.2 AHNP000000000.2 AE016823/4 AHMN000000000.2 AHMN000000000.2 AKWY000000000.2 AOHB000000000.2 AHNC000000000.2 AHMO000000000.2 AKWZ000000000.2 AHMM000000000.2 AHOO000000000.2 AKWX000000000.2 CP000786/7 AKXE000000000 AOGW000000000.2 AOGY000000000.2 AOGZ000000000.2 AOGX000000000.2	En este trabajo se definieron muchos aspectos bioinformáticos sobre el análisis de datos genómicos: reconstrucciones metabólicas reconstruidas a través de datos genómicos podría indicar el nivel de adaptación de leptospiros en mamíferos incluyendo biosíntesis de ácido siálico, el metabolismo de Porfirin y por primera vez la demostración de la autotrofia de cobalamina (B12) como factor de virulencia bacteriana. En este trabajo aplicando el sistema de CRISPS/Cas demostró que se encuentra presente solo en cepas patógenas de leptospiros, sugiriendo un mecanismo potencial de reorganización genético. También se describen varios genes de virulencia y familia de genes. Se descubrieron proteínas novedosas específicas de las especies patógenas que se encuentran en los mecanismos de secreción, modificación, expresión génica de señales de respuesta, movilidad y sistemas quimiotáxicos.	Fouts y col., 2016

Genomas secuenciados	Análisis filogenéticos	Base de datos	Conclusiones/ descubrimientos	Referencia
N= 1	Se utilizó OrthoMCL (Li y col., 2003) para realizar el agrupamiento de genes del genoma anotado en este trabajo perteneciente al serovar Hardjo incluyendo 23 otros genomas de <i>Leptospira</i> spp. Las secuencias de proteínas fueron alineadas utilizando MAFFT (Kato y Standley, 2003) y se utilizó Gblocks (Talavera y col., 2007) para seguir trabajando sobre dichos alineamientos. Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando PhyML 3.0 (Guindon y col., 2010) bajo el mejor modelo de predicción empleando ProTest3 (Darriba y col., 2011).	Las secuencias crudas obtenidas por las lecturas del MiSeq fueron depositadas en los archivos de lectura de secuencias (SRA) bajo el número de acceso: SRX1830060	La posición del serovar Hardjo evolutivamente respalda la hipótesis que la convergencia del alelo (loci) rfb de <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo y <i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo son probablemente consecuencia de una herencia ancestral originada por la transferencia lateral de genes.	Llanes y col., 2016
N=3	Tres genomas fueron secuenciados, las cepas son: CLM-U50T, CLM-R50 y IVIC-Bov1. Aisladas de un paciente, una rata y un bovino, respectivamente. Se realizó el análisis filogenético con el gen 16S rARN mediante el agrupamiento de Neighbour-joining utilizando MEGA 6.0 (Tamura y col., 2018) con 1000 repeticiones para determinar el valor de bootstrap. El porcentaje de similitud con las especies analizadas fue del 100 %, sin embargo, estas secuencias fueron del 93 %. Las tres secuencias de las cepas nombradas formaron un grupo monofilético dentro del clado de las especies de leptospiras intermedias. Se utilizó la base de datos eggNOG versión 3.0 (Powell y col., 2012) para fortalecer la filogenia establecida.	Los ensamblamientos de los tres genomas fueron depositados en GenBank bajo los números de acceso: NETS00000000, NFUQ00000000 y NFUP00000000 de las cepas CLMU50T, IVIC-Bov1 y CLM-R50, respectivamente.	El promedio de identidad de nucleótidos obtenido entre las tres cepas fue de >99 %, y menos del 89 % con respecto a las demás especies de leptospira descriptas. Dada esta evidencia, se propuso en este trabajo la pertenencia a una sp. nov. Perteneciente al clado de las especies intermedias (<i>L. venezuelensis</i> sp.nov).	Puche y col., 2018

Genomas secuenciados	Análisis filogenéticos	Base de datos	Conclusiones/ descubrimientos	Referencia
N= 327	Para poder realizar un análisis filogenético basado en alelos (loci) de cgMLST, estos fueron extraídos y alineados como secuencias proteicas utilizando el programa MAFFT V7 (Katoh y col., 2013). Se elaboró una súper matriz de caracteres utilizando IQ-Tree v1.5.4 (Nguyen y col., 2015) para elaborar un árbol filogenético considerando el modelo evolutivo LG + G. Para poder evaluar los esquemas clásicos de MLST con los cgMLST se compararon con los publicados en la Universidad de Oxford.	En este trabajo se elaboró un esquema de clasificación utilizando cgMLST, los alelos se encuentran publicados en las plataformas: 1. https://bigsd.b.pasteur.fr/leptospira/ 2. https://pubmlst.org/leptospira/ 3. http://www.comparin-gpartitions.info	Este novedoso análisis filogenético mostró que el análisis por cgMLST es robusto y con una lata precisión ante datos faltantes para la clasificación por clados, subclados, grupos clonales y tipos de secuencia cgMLST (sequence types cgMLST). Se determinó el subclado S2 (especies saprófitas 2) incluyendo nuevas especies dentro de este grupo y se definieron grupos clonales.	Guglielmini y col., 2019
N= 3	Se elaboraron bibliotecas SMRTbell secuenciadas bajo el sistema PacBio RS II system (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, EUA). El mínimo de cobertura de las lecturas fue de 30X para los tres aislamientos analizados. El dendrograma fue basado en un blast genómico utilizado la base de datos genómicos del NCBI (whole genome database) incluyendo 311 genomas de <i>L. interrogans</i> .	Genbank bajo los siguientes números de acceso: CP039256 CP039257 CP039258 CP039259 CP039260 CP039283 CP039284 CP039285 CP039286	Análisis más profundos sobre nuevos genomas reportados en la actualidad podrán mejorar el conocimiento sobre la patogénesis y evolución del género <i>Leptospira</i> spp.	Senevirathna y col., 2020



CAPÍTULO V

Detección molecular de leptospiras
en el medioambiente



Considerando el estudio de la leptospirosis en la interfase animal-humano-ambiente es relevante comentar los antecedentes que existen en cuanto a las leptospiras detectadas y descritas en el ambiente. Sobre todo, a nivel nacional, entre los cuales se encuentran: Brihuega y col. (2006), Francoise y col. (2013) y Scialfa y col. (2018). En los tres trabajos se aislaron leptospiras a partir de muestras en cuerpos de agua. En el primer trabajo se aisló *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en el Río Reconquista (provincia de Buenos Aires), en el segundo *L. borgpetersenii* en la localidad de Casilda (provincia de Santa Fe) y en el tercero cepas biflexas n/d (provincia de Buenos Aires). En el informe de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AVVLD) (2008) también se reportan aislamientos provenientes de cuerpos de agua (ríos, lagos y riachuelos) de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Corrientes y Jujuy. Durante 1961-1996 se han aislado un total de 47 cepas saprófitas y 5 cepas patógenas que pertenecen a las especies *L. interrogans*.

Es particularmente difícil aislar leptospiras del medioambiente (agua o barro) debido a que se debe considerar que estas se encuentran dispersas en el medio y se debe contar con una metodología distinta a la aplicada en muestras clínicas. Es por esta razón que las herramientas moleculares son aplicadas con frecuencia en muestras ambientales para poder detectar sobre todo la presencia de leptospiras patógenas.

Son muy escasos los estudios sobre leptospiras presentes en el ambiente (o leptospiras ambientales), sobre todo cepas o especies patógenas principalmente por la dificultad del aislamiento a partir de este tipo de muestras y también considerando que las cepas saprófitas se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, lo cual puede ocasionar una contaminación en el cultivo. Es por esta razón que es dificultoso aislar cepas patógenas del ambiente, sin embargo, existe un creciente interés en tratar de entender el ciclo de vida de esta bacteria en el contexto de la interfase animal-humano-ambiente y su capacidad de supervivencia en el ambiente. Estudios genómicos han sugerido que las cepas virulentas del género *Leptospira* spp. han evolucionado a partir de cepas saprófitas de vida libre presentes en el ambiente (ver capítulo IV).

En el año 2018 (Casanova y col.) se realizó un estudio sobre la cuantificación de la presencia de leptospiras patógenas en un microcosmos

ambiental, realizando la cuantificación por RT-PCR y PMA-RT-PCR. Se realizó el ensayo con *L. interrogans* serovar Copenhageni en matrices artificiales que representarían las condiciones ambientales (*in vitro*). Los parámetros de supervivencia obtenidos en este estudio podrían colaborar en comprender mejor la distribución de las cepas patógenas de leptospiras en el ambiente y mejorar las predicciones de riesgos de infección en humanos y animales en áreas endémicas. Se encontró que luego de un crecimiento exponencial (12-21 días de incubación) decreció el cultivo en cantidad, caso contrario a las cepas establecidas en cultivos de referencia.

Se han desarrollado técnicas de amplificación de ADN de *Leptospira* spp. a partir de muestras ambientales. En una revisión (Bierque y col., 2020) se empleó la amplificación del gen 16S rARN para detectar tanto especies saprófitas como patógenas en cepas aisladas del ambiente, no logrando mayor discriminación entre dichas especies, es por esto que, muchos estudios usan adicionalmente un panel de genes que incluye: lipL32 (Rawlins y col., 2014) ; flaB (Saito y col., 2014); sec Y (Benacer y col., 2014) y lfb1 (Luchini y col., 2008). Esto representa un polimorfismo amplio dentro del género *Lepstospira* spp., comentado en el capítulo III. Es recomendable el uso de dos genes aplicando una PCR dúplex o más genes aplicando una PCR múltiplex. La ventaja de aplicar la RT-PCR sobre muestras ambientales para amplificar LipL32 y 16S rARN es que detectaría un mayor abanico dentro de las especies del género *Leptospira* spp. No se habla en los trabajos sobre el método de extracción eficaz, la mayoría utiliza kits de extracción con las muestras de agua, no sobre las muestras de barro, ya que estas obstruyen el filtro de la columna de los kits de extracción. Como se mencionó en el capítulo I, el vehículo de las leptospiras patógenas es el agua, es por esta razón que cuando se trata de detectar o aislar leptospiras del ambiente el momento idóneo es después de lluvias. Lo mas idóneo es sembrar la muestra de agua *in situ* para tener mayor éxito de aislamiento de leptospiras.



CAPÍTULO VI

Protocolos de PCR



En este capítulo se resumen los diferentes protocolos de PCR utilizados en el país indicando en cada caso las referencias sobre el fundamento de los genes utilizados. Estas técnicas son para el diagnóstico molecular y caracterización de leptospiras patógenas, amplificando la mayoría de las especies. Se detallan los siguientes protocolos de PCR: A) PCR dúplex, B) PCR LipL32, C) PCR Hardjo Bovis, D) PCR rrs (16S), E) LAMP, F) PCR MLVA. Algunas de estas herramientas se encuentran publicadas bajo "Grupo de leptospriosis" (2018) en la bibliografía de este manual.

La PCR rrs (16S) (D) es usada para amplificar todas las especies de leptospiras incluyendo patógenas, intermedias y saprófitas. Es aplicada principalmente en casos donde las demás PCR son inconclusas y es una herramienta de caracterización molecular del aislamiento. Estas secuencias obtenidas son analizadas mediante Blastn del NCBI (Genbank) y posteriormente analizados por filogenia. Sin embargo, la ILS (2018) expone que las secuencias deberían ser analizadas en bases de datos que contengan secuencias curadas.

Como se mencionó en el capítulo II (estudios genómicos) la topografía de las especies del género *Leptospira spp.* va cambiando continuamente, describiendo especies nuevas y reagrupando los clados filogenéticos de manera dinámica. Se hace esta aclaración, ya que las PCR detalladas en esta sección son usadas para detectar las especies patógenas de leptospiras actualmente presentes en el país. Este aspecto puede cambiar en un escenario futuro, sin embargo, esta guía es una base fundamental para poder conocer los antecedentes y poder, a medida que las herramientas avancen, incorporarlas.

Existen consideraciones generales y recomendaciones para la realización de PCR. Se debe contar con una cabina de seguridad, en la cual solo se maneje ADN. El área debe estar esterilizada y el templado se debería colocar en la mix en otro lugar para evitar la contaminación cruzada. Los procedimientos de pre-PCR (extracción y purificación de ADN) se manejan utilizando guantes de nitrilo y con tips con filtro. Para los procedimientos post-PCR (manipulación de amplicones) se pueden realizar utilizando tips sin filtro. Lo recomendable es tener un set de micropipetas para cada fase respectivamente.

Procedimientos pre-PCR

Preparación de la solución stock de primers

Los primers llegan liofilizados (en polvo) y se deben resuspender a una concentración de 200 μM (200 pmol/ μL).

- 1. Calcular el H_2O libre de ADN para añadir a cada primer.

$$\text{Vol H}_2\text{O} = \frac{\text{nmoles dNTP} \times 1000 \text{ pmol/nmol}}{200 \text{ pmol}/\mu\text{l}}$$

$$\text{Vol H}_2\text{O} = \text{nmoles dNTP} \times 5$$

Ej: Primer 1 (4abis del locus VNTR4)

$$\frac{38,4 \text{ nmoles} \times 1000 \text{ pmol/nmol}}{200 \text{ pmol}/\mu\text{l}} = 38,4 \times 5 = 192 \text{ uL H}_2\text{O}$$

- 2. Repetir el cálculo para cada primer.
- 3. Centrifugar los primers (1 spin).
- 4. Colocarlos en orden de más pequeño a más grande. (Ej.: 4a, 4b).
- 5. Preparar el área de trabajo, es decir, la cabina de PCR.
- 6. Resuspender con la cantidad de agua calculada, (los valores con 0,5 redondearlos hacia abajo. Ej: 205,5 μl se agregan 205 μl). Resuspender el agua tips de 1000 μl con filtro.
- 7. Luego se dejan a temperatura ambiente 2 minutos y para solubilizarla se mezclan utilizando los dedos (no agitar en el vórtex).

Preparación de la concentración de uso de primers

- 1. La concentración de uso de cada primer es de 50 μM .

$$200 \mu\text{l} \left\{ \begin{array}{l} 100 \mu\text{l} \\ 50 \mu\text{l} \text{ 4a} \\ 50 \mu\text{l} \text{ 4b} \end{array} \right. \xrightarrow{\text{H}_2\text{O DNA libre}} \text{Preparación del mix de los primer para usar}$$

- 2. Añadir las cantidades indicadas (Paso 1) en eppendorf de 1,5 ml previamente autoclavados.
- 3. Conservar en freezer (primers, solución madre, mix de los primers).

Preparación de dNTPs 10mM c/u

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 = \frac{1000 \mu\text{l} \times 10\text{mM}}{100\text{mM}}$$

$$V_1 = 100 \mu\text{l}$$

Entonces:

100 μl de cada dNTP: 400 μl + 600 μl de agua libre = 1000 μl

Consideración sobre la preparación de las mix para PCR

Las enzimas polimerasas (Taq comerciales) incluyen el buffer y el MgCl_2 para su uso en la mix de las PCR. Dependiendo de las unidades que tengan las Taq y las concentraciones, se deben poner a punto previamente las mix detalladas a continuación. El uso de Taq diferentes puede variar el programa del termociclador. También en algunos casos se debe ajustar la cantidad de MgCl_2 para utilizar para poder disminuir las amplificaciones inespecíficas que podrían presentarse.

Extracción y purificación de ADN genómico utilizando la resina Chelex-100

Preparación de la resina Chelex-100

- 1. Mezclar 5 g de Chelex-100 en 100 ml de agua bidestilada estéril.
- 2. Autoclavar durante 15 min a 120 °C.
- 3. Trabajar en flujo: verificar el pH después de que se enfríe la solución y ajustar el pH a 9.0.
- 4. Homogenizar y fraccionar (150 μl) en tubos eppendorf de 0,5 ml para PCR pared delgada. Trabajar en flujo laminar.
- 5. Guardar a 4 °C hasta su uso.

Nota: la solución stock de Chelex tiene una duración de 1 año a 4 °C, cada vez que se fraccione para su uso se debe trabajar en condiciones de esterilidad, en un flujo laminar y no exponer el Chelex a luz UV.

Extracción de ADN

- 1. Se toma una pequeña fracción del parénquima del órgano (evitar la toma de sangre) y se coloca en los tubos previamente fraccionados de Chelex-100 (4 °C). En el caso de muestras líquidas (agua/orina) se toman aproximadamente 20/50 µl con tips con filtro y se colocan en el tubo con Chelex.
- 2. Se lleva a termobloque respetando el siguiente programa: 56 °C por 20 minutos y luego a 100 °C por 8 minutos.
- 3. Realizar agitación (sin vórtex) hasta que se vea espuma. Conviene raspar el eppendorf, con cuidado, en una gradilla de plástico.
- 4. Centrifugar 2 minutos a 9900 g y tomar el sobrenadante evitando la toma de Chelex, unos 100 µl con tips con filtro.
- 5. Guardar a -20 °C, correctamente rotulado.

Consideraciones: cuando se parte de un cultivo semisólido es necesario hacerlo con pipeta Pasteur, tomando la muestra desde el anillo de desarrollo de la bacteria. Con dos o tres gotas basta.

Reactivo:

Chelex-100, Molecular Biology Grade Resin. Marca: Bio-Rad. (50 g) Cat: (142-1253).

Extracción por hervor (no es ADN purificado)

- 1. Se toman aproximadamente 100 µl del cultivo. Dejar en termobloque (o hervido) 30 min a 96 °C.
- 2. Guardar a -20 °C.

Protocolo (preparación de la mix para PCR)

- 1. Se desinfecta la cabina para la realización de la mix de la PCR con alcohol 70 %. Se colocan en el flujo los materiales a utilizar con aproximadamente 10-15 minutos de luz UV (tips, guantes de nitrilo, fibrón, pipetas, gradillas, descartador). No colocar los reactivos.
- 2. Realizar mix en la cabina (ver cuadro con los reactivos de la PCR a realizar).
- 3. Rotular los tubos de PCR con marcador indeleble.

- 4. Colocar los μl de mix correspondientes a cada tubo de PCR y mantenerlos en una gradilla refrigerada.
- 5. Colocar el templado (ADN molde, purificado) correspondiente a cada tubo y llevar a termociclador (es recomendable realizar este paso en otro lugar).

A) PCR dúplex

Fundamento: (Gravekamp y col.,1993).

Esta PCR diagnóstico dúplex consiste en la detección de leptospiras patógenas.

Con los primers G1-G2 amplifica un fragmento de 285 pb del gen secY correspondiente a las cepas patógenas de: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. meyeri* (cepa ICF). Con el par B64-I-B64-II amplifica el gen flab de *L. kirschneri*, generando un fragmento de 563 pb.

Mix reactivos		Programa de termociclador		
	Volumen (μl)			
Buffer 10X	5	5 min	94 °C	x1
MgCl	3	1,5 min	94 °C	x35
DNTPs	0,5	1 min	55 °C	
Taq polimerasa	0,25	2 min	72 °C	
Agua libre de nucleasas	38,25	7 min	72 °C	x1
Mix primers A (G1/G2)	0,5			
Mix primers B (B64I/B64II)	0,5			
Volumen de Mix = 48 μl				
TEMPLADO	2			
Volumen final = 50 μl				

Primers	
G1	5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT
G2	5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG
B64I (modificado)	5' ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC
B64II (modificado)	5' TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA

B) PCR LipL32

Fundamento: (Levett y col., 2005).

Esta PCR diagnóstica detecta especies de leptospiras patógenas a partir de la amplificación del gen lipL32 de 423pb.

Mix reactivos:		Programa de termociclador		
MIX PCR lipL32	Volumen/muestra	94 °C	5 min	x1
Reactivos	(μ l)	94 °C	30 seg	
Buffer 10X	2,5	58 °C	30 seg	x35
MgCl ₂	1,5	72 °C	40 seg	
dNTPs (10 mM c/u)	0,5	72 °C	5 min	x1
Primers (50 μ M c/u)	1			
ADN polimerasa	0,25			
H ₂ O PCR	17,25			
Volumen de Mix = 23 μ l				
ADN templado	2			
Volumen final = 25 μ l				

Primers:	
LipL32 – 270F	5' – CGC TGA AAT GGG AGT TCG TAT GAT T
LipL32 – 692R	5' – CCA ACA GAT GCA ACG AAA GAT CCT TT

C) PCR *Hardjo bovis*

Fundamento: (Zuerner y col., 2011).

Amplifican un producto de 630 pares de bases del gen IS1533 que corresponden a 85 copias del genoma de *L. borgpetersenii* serovar *Hardjo bovis*.

Mix reactivos

MIX PCR lipL32	Volumen (µl)
Buffer 10X	2,5
MgCl	1
dNTP	1
Mix primers (P1805+P1809)	0,5
Taq polimerasa	0,25
Agua libre de nucleasas	14,75
Volumen de Mix = 20 µl	
TEMPLADO	5
Volumen final = 25 µl	

Programa de termociclador:

2 min	94 °C	x1
1:30 min	94 °C	
2 min	67 °C	x30
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	x1

Primers

P1805	5-GCGGAAAGTGAACCGTATCGAG-3
P1809	5-CTGATATTCGCG GGTTGGAAGG-3

D) PCR rrs

Fundamento: (Position Statement del subcomité de taxonomía de la ILS, 2018). Para amplificar el gen rrs (16S rARN), presente en todas las especies del género *Leptospira* spp. Esta herramienta de caracterización molecular requiere de la secuenciación posterior del amplicón obtenido (el fragmento es de 1.300 bp).

MIX reactivos

Mix reactivos	Volumen (µl)
Buffer 10X	2,5
MgCl ₂	3
dNTPs (10 mM c/u)	0,5
ADN polimerasa	0,25
Primers (50 µM c/u)	1
H ₂ O PCR	34,75
Volumen de Mix = 42 µl	
ADN templado	8
Volumen final = 50 µl	

Programa de termociclador

94 °C	3 min	x1
94 °C	2 min	
69 °C	1,5 min	x30
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	x1

Primers

rrs2	5' – ACG TAT TCA CCG CGG CAT GC
rrs1	5' – CGC TGG CGG CGC GTC TTA AAC ATG C

D) LAMP – Leptospirosis

Fundamento: (Koizumi y col., 2012) y modificado en Grune Loffler y col. (2016).

Esta LAMP amplifica especies patógenas de *Leptospira* spp. (ver detalles en el capítulo III).

Mix (x1):

		Volumen (μl)
Primers	FIP	0,8
	BIP	0,8
	F3	0,25
	B3	0,25
	FL	0,8
	BL	0,8
Buffer		2,5
Betaína		5
MgSO ₄		2,5
dNTPs		1,75
H ₂ O libre de nucleasas		3,55
Volumen final de mix = 19 μl; en un eppendorf de 0,5 ml		
Polimerasa <i>Bst</i>		1
Templado purificado		5
Verde de malaquita pH:4,9		5
Programa	66 °C – 60 minutos 95 °C – 5 minutos	

Consideraciones:

El verde de malaquita se prepara artesanalmente: se realiza una solución madre de verde malaquita al 1 % p/v (volumen final= 10 ml) y luego se realizan diluciones para obtener solución de trabajo: 0,02 % (dil 1/50: 1 ml de solución madre llevada a un volumen final de 50 ml). Se alicuotan 5 ml de dicha solución en tubos cónicos de 15 ml para llevar

a diferentes pH con solución de NaOH 1N. De esta manera, se obtienen soluciones de verde malaquita al 0,02 % en un rango de pH (4,2-12).

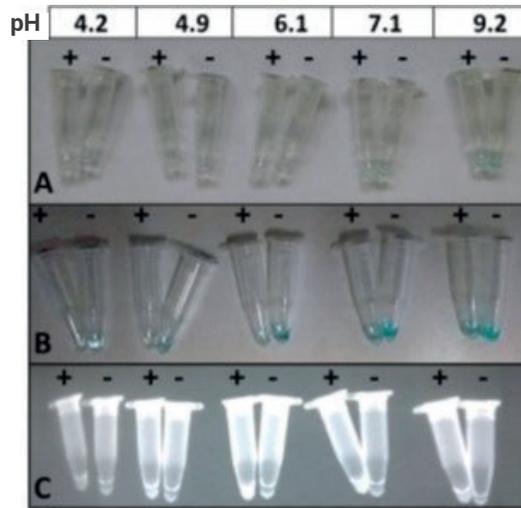


Figura 22. Detección visual de los productos de LAMP utilizando verde malaquita. (A) Tubos luego de la reacción de LAMP; (B) Tubos luego de la exposición a luz UV; (C) Tubos irradiados con luz UV. (Fuente: Grune Loffler y col., 2016).

Primers:

	Secuencia 5'-3'
FL	(DNA)- GTTGAGCCCGCAGTTTTTCAC
BL	(DNA)- AATCCAGGTGTAGCGGTGA
F3	(DNA)- TCATTGGGCGTAAAGGGTG
B3	(DNA)- AGTTTTAGGCCAGCAAGTCG
FIP	(DNA)- TAGTTTCAAGTGCAGGCTGCGAGCGGACATGTAAGTCAGG
BIP	(DNA)- GGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGGCCACTGGTGTTCCTCCA

E) PCR MLVA

Fundamento: tipificación molecular de cepas patógenas de *Leptospira* spp. por el análisis de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA, siglas en inglés).

Mix (1x)

	Volumen (µl)
Buffer 10X	5
MGCL	2
DNTPs	1
Taq polimerasa	0,25
Agua libre de nucleasas	34,75
Volumen de Mix = 43 µl	
Mix de <i>primer</i>	2
Templado	5
Volumen final = 50 µl	

Se colocan 43 µl de la mix en cada eppendorf (dependiendo de la cantidad de cepas a tipificar y el set de primer que se use). Como ejemplo, tomaremos 2 cepas, 1 será tipificada mediante el set de primer propuesto por Majed y col. (2005) y Pavan y col. (2011). Este set de primers es específico para cepas de la especie *L. interrogans* y cuenta con 7 primers que flanquean los siguientes loci: VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR19, VNTR23 y VNTR 31. Para la segunda cepa utilizaremos un segundo set de primers diseñados específicamente para *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaün y col., 2006). Este set cuenta con 5 primers que flanquean los loci: VNTR4, VNTR7, VNTR10, VNTRLb4 y VNTR Lb5.

Se prepara la mix para un total de 12 reacciones en un microtubo de 1,5 ml de capacidad:

Para 12 reacciones	Volumen (µl)
Buffer	60
MGCL2	24
DNTPs	12
Taq polimerasa (Highway)	0,15
Agua libre de nucleasas	419,88

Se rotulan los eppendorfs de PCR para poder diferenciar los primers que se añaden a cada eppendorf. Usamos la siguiente enumeración: del 1 al 7 para las reacciones de *L. interrogans* serovar Pomona Pomona, y letras para *L. borgpetersenii* serovar Ballum Castellonis (de la A hasta E).

Se colocan en cada eppendorf de PCR 43 µl de la mix. A cada eppendorf se le añaden 2 µl del primer que le corresponde, es decir:

Enumeraciones:

Para las reacciones de *L. interrogans*:

1-VNTR4; 2-VNTR7; 3-VNTR9; 4-VNTR10; 5-VNTR19; 6-VNTR23; 7-VNTR31

Para las reacciones de *L. borgpetersenii*:

A-VNTR4; B-VNTR7; C-VNTR10; D-VNTRLb4; E-VNTRLb5

A cada reacción (eppendorf) se le añaden 5 µl del templado de la cepa para tipificar. Una vez culminado con este paso final, se pueden colocar los tubos en el termociclador programado con el siguiente programa:

5 min	94 °C	x1
30 seg	94 °C	
30 seg	55 °C	x35
1 min 30 seg	72 °C	
10 min	72 °C	x1

Procedimientos post-PCR

Preparación de gel loading solución para el revelado de amplicones por electroforesis.

Proporciones:

Azul de bromofenol	0,05 % P/V
Sacarosa	40% P/V
EDTA pH8	0,1 M
SDS	0,5 % P/V

Reactivos:

EDTA pH 8 0,5 M Promega V4231 (100 ml)

Azul de bromofenol ANEDRA (10 g)

Sacarosa MERCK (250 g)

Preparación de 75 ml:

Azul de bromofenol	0,0375 g
Sacarosa	30 g
EDTA pH8 0,5M	15 ml
SDS	0,375 g

Poner en estufa a 37 °C por 30 minutos cuando ya esté mezclado para terminar de disolver el SDS precipitado, y fraccionar. Siempre calentar un poco cuando se fracciona desde la solución madre.

Indicaciones para la siembra del gel de electroforesis

- 1. El TAE comercial es de 40X y debe usarse a 1X. Se debe fraccionar la solución madre en frascos falcón de 15 ml, que se guardan en la heladera.
- 2. Preparación de TAE 1X: agregar los 15 ml de TAE 40X del falcón y completar a 600 ml con agua destilada (se mantiene a 4 °C).
- 3. Pesar la agarosa (1 g) se mantiene a temperatura ambiente.
- 4. Fraccionar el bromuro de etidio en la concentración para utilizar. Guardar a temperatura ambiente y a oscuras (se fracciona en eppendorf). Utilizarlo en un lugar únicamente destinado para la siembra de geles puesto que es altamente tóxico y mutagénico.
- 5. Para un gel de agarosa de 100 ml se utilizan 3 µl de bromuro de etidio directamente en la solución de la agarosa ya diluida.
- 6. Cuando se siembran los amplicones se debe tomar en cuenta tener el marcador molecular (100 bp) en el lado izquierdo del gel para una mayor visualización de los tamaños de los amplicones obtenidos.

Consideraciones finales

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes tienen implicaciones biológicas de importancia, muchas especies de vida silvestre son reservorios de patógenos que amenazan la salud de las personas y de los animales domésticos (Daszak y col., 2000). La presencia de animales silvestres en áreas urbanas y suburbanas está cada vez más arraigada, debido a la invasión de los ecosistemas naturales por el hombre, no solo con la extensión de ciudades y asentamientos de poblaciones, sino también con las intensificaciones de cultivo y producción de ganado (Jones y col., 2013). Los animales silvestres pueden diseminar leptospiras patógenas como reservorios u hospedadores accidentales de acuerdo a factores que tienen que ver con características propias de las especies, condiciones ambientales y susceptibilidad de los animales a la infección, por lo que es importante conducir estudios que permitan dilucidar el papel de cada especie en la presencia de la enfermedad en las zonas endémicas. Existe una relación simbiótica entre la leptospira y su reservorio que es de gran importancia para la perpetuación de la enfermedad en la población animal.

Bibliografía

1. Adler, B. 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology. Volume 387, 295 p.
2. Ahmed, A.; Klaasen, H.L.B.M.; Van der Veen, M.; Van der Linden, H.; Goris, M.G.A.; Hartskeerl, R.A. 2012. Evaluation of real-time PCR and culturing for the detection of leptospires in canine samples. Adv. Microbiol. 2: 162-170.
3. Antwerpen, M.; Ilin, D.; Georgieva, E.; Meyer, H.; Savov, E.; Frangoulidis, D. 2011. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 30(7):923-30.
4. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD) 2006. Comisión Científica sobre Leptospirosis de la República Argentina. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Buenos Aires, Argentina. Fundación Mundo Sano, 18 p.

5. Bal, A.E.; Gravekamp, C.; Hartskeerl, R.A.; De Meza-Brewster, J.; Korver, H.; Terpstra, W.J. 1994. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (8):1894-1898.
6. Benacer, D.; Woh, P.Y.; Mohd Zain, S.N.; Amran, F.; Thong, K.L. 2013. Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environ* 28: 135-140. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12154>
7. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acid. Res.* 27 :573-80.
8. Bierque, E.; Thibeaux, R.; Girault, D.; Soupe´-Gilbert, M.E.; Goarant, C. 2020. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE* 15(1): e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>
9. Boggia, V. 2013. Diagnóstico de leptospirosis en bovinos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Tesis en licenciatura en ciencias biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
10. Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Van Dillen, P.M.E.; Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.
11. Boonsilp, S.; Thaipadungpanit, J.; Amornchai, P.; Wuthiekanun, V.; Bailey, M.S.; Holden, M.T.; Zhang, C.; Jiang, X.; Koizumi, N.; Taylor, K.; Galloway, R.; Hoffmaster, A.L.; Craig, S.; Smythe, L.D.; Hartskeerl, R.A.; Day, N.P.; Chantatritra, N.; Feil, E.J.; Aansen, D.M.; Spratt, B.G.; Peacock, S.J. 2013. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(1):e1954. doi: 10.1371/journal.pntd.0001954
12. Brenner, D.; McWhorter, A.; Knutson, J.; Steigerwalt, A. 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* 15:1133-1141.
13. Brenner, D.; Kaufmann, A.; Sulzer, K.; Steigerwalt, A.; Rogers, F.; Weyant, R. 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.
14. Brihuega, B.; Auteri, C.; Romero, G.; Samartino, L. 2006. Aislamiento de una cepa patógena de *Leptospira* de un río urbano: Respuesta frente a quinolonas fluoradas. *Rev. Med. Vet.* 87:144-6.4.
15. Brihuega, B.; Pavan, M.; Cairo, F.; Auteri, C.; Funes, D.; Romero, G.; Samartino, L. 2007. *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). *Rev. Arg. Microb.* 39:19.
16. Brihuega, B.; Romero, G.; Auteri, C.; Samartino, L. 2007. Immunofluorescence and serodiagnosis of *Leptospira* in Farm Animals. *Rev. Devs in Biolog.* 128: 159-160.

17. Brihuega, B. 2008. Leptospirosis: Diagnóstico y Tipificación. En: Cacchione, R.; Durlach, R.; Martino, P. (ed.). Temas de Zoonosis IV. Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina. 221-227 pp.
18. Brihuega, B. 2011. Importancia de los animales silvestres en la leptospirosis. En: Basualdo, J.; Cacchione, R.; Durlach, R.; Martino P.; Seijo, A (ed.). Temas de Zoonosis IV. Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina. 159-174 pp.
19. Cacchione, R.A.; Bulgini, M.J.D.; Cascelli, E.S.; Martinez, E.S. 1965. Leptospirosis en animales silvestres-Estado actual de sus investigaciones-Aislamientos y clasificación de Cepas Argentinas. Revista de Investigaciones Agropecuarias Serie 4-Patología animal 13(II), 173-197.
20. Caimi, K.; Varni, V.; Melendez, Y.; Koval, A.; Brihuega, B.; Ruybal, P. 2012. A combined approach of VNTR and MLST analysis: improving molecular typing of Argentinean isolates of *Leptospira interrogans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107: 644-651.
21. Campioni, F.; Davis, M.; Medeiros, M.I.; Falcão, J.P.; Shah, D.H. 2013. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *Salmonella* enteritidis strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American strains. Int J Food Microbiol. 15;162(2):174-81.
22. Casanovas-Massana, A.; Pedra, G.G.; Wunder, E.A.; Diggle, P.J. Jr.; Begon, M.; Ko, A.I. 2018. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. Appl Environ Microbiol 84:e00507-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>
23. Cerqueira, G.M.; Picardeau, M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 9:760-768. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009
24. Cespedes, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. Revista peruana Med. Exp. Salud Publica 22(4), 2005.
25. Cheng-Hsun, C.; Tang, P.; Cheng-Chieh, H.; Chih-Wei, Y. 2014. Potential impact on kidney infection: a whole-genome analysis of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. Emerging Microbes & Infections, 3:1, 1-11. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.78>
26. Childs, J.E.; Richt, J.A.; Mackenzie, J.S. 2007. Introduction: Conceptualizing and partitioning the emergence process of zoonotic viruses from wildlife to humans. Curr Top Microbiol Immunol 315:1-31.
27. Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E.; Fish, J.; Chai, B.; Farris, R.J.; Kulam-Syed-Mohideen, A.; McGarrell, D.; Marsh, T.; Garrity, G.; Tiedje, J. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37 D141-5. doi: 10.1093/nar/gkn879
28. Contreras-Moreira, B.; Vinuesa, P. 2013. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. Appl Environ Microbiol. 79(24): 7696-7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
29. Coordinación de Políticas Socioambientales. 2019. Clima y Salud en la Argentina. Diagnóstico de situación. Serie: temas en salud Ambiental N.º 31. 103 p.

30. Coulagross-Schouten, A.; Mazet, J.; Gulland, F.; Miller, M.; Hietala, S. 2002. Diagnosis and Seroprevalence of leptospirosis in California Sea Lions from Coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*. 38(1): 7-17.
31. Darling, A.C.; Mau, B.; Blattner, F.R.; Perna, N.T. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*. 14, 1394-1403.
32. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 27: 1164-1165. doi: 10.1093/bioinformatics/btr088
33. Daszak, P.; Cunningham, A.; Hyatt, A. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449.
34. Draghi, M.G.; Brihuega, B.; Benítez, D.; Sala, J.M.; Biotti, G.M.; Pereyra, M.; Homse, A.; Guariniello, L. 2011. Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 43 :42-44.
35. Ellis, W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am., Food anim. pract.* 10, 463-478.
36. Eshghi, A.; Lourdault, K.; Murray, G.L.; Bartpho, T.; Sermswan, R.W.; Picardeau, M.; Adler, B.; Snarr, B.; Zuerner, R.L.; Cameron, C.E. 2012. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect. Imm.* 80(11):3892-3899.
37. Exner, M.M.; Lewinski, M.A. 2003. Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46(4):235-40. doi: 10.1016/s0732-8893(03)00080-4
38. Faine, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis, WHO offset publication N.º 67. World Health Organization, Geneva. 161 p.
39. Faine, S. 1994. *Leptospira* and Leptospirosis. CRC Press, Boca Raton. 353 p.
40. Faine, S.; Stallman, N.D. 1982. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *Int. J Syst Bacteriol.* 32:461-463.
41. Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. 1999. "Leptospire and leptospirosis". MediSci; Melbourne, Australia. 272.
42. Feng, Z.; Zhang, B.; Ding, W.; Liu, X.; Yang, D.L.; Wei, P.; Cao, F.; Zhu, S.; Zhang, F.; Mao, Y.; Zhu, F.; Fillo, J.K. 2011. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system *Cell Res* 2013 Oct;23(10):1229-32. doi: 10.1038/cr.2013.114
43. Fouts, D.E.; Matthias, M.A.; Adhikarla, H.; Adler, B.; Amorim-Santos, L.; Berg, D.E. 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

44. François, S.; Brihuega, B.; Grune, S.; Gattarello, V.; Correa, D.; Petrakovsky, J.; Gualtieri, C.; Arestegui, M. 2013. Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. Revista Cubana de Medicina Tropical. N.º 2.
45. Galloway, R.L.; Levett, P.N. 2008. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78: 628-632.
46. Goarant, C.; Trueba, G.; Bierque, E.; Thibeaux, R.; Davis, B.; De la Peña, M. 2019. Leptospira and Leptospirosis. En: Rose, J.B.; Jiménez-Cisneros, B. (ed.). Global Water Pathogen Project. 33 p. (Disponible: <http://www.waterpathogens.org> consultado: 15/01/2021).
47. Gravekamp, C.; Van de Kemp, H.; Franzen, M.; Carrington, D.; Schoone, G.J.; Van Eys, G.J.J.M.; Everard, C.O.R.; Hartskeerl, R.A.; Terpstra, W.J. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol. 139: 1691-1700.
48. Grune Loffler, S. 2014. Aislamiento y caracterización genotípica de leptospiros provenientes de animales silvestres en tres ecoregiones argentinas mediante la técnica del Múltiple-Locus Variable-number tandem repeat Análisis (MLVA): Coincidencia con genotipos provenientes de animales de producción. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 135 p.
49. Grune Loffler, S.; Rago, V.; Martínez, M.; Uhart, M.; Florin-Christensen, M.; Romero, G.; Brihuega, B. 2015. Isolation of a Seawater Tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). PLoSONE 10(12): e0144974. doi:10.1371/journal.pone.0144974
50. Grune Loffler, S.; Leiva, C.; Scialfa, E.; Redondo, L.; Florin-Christensen, M.; Martínez, M.; Romero, G.; Brihuega, B. 2016. Detection of pathogenic leptospiral DNA traces in canine sera serum samples by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Immunol. Infect. Dis. 4: 39-43.
51. Grune Loffler, S.; Brihuega, B.; Samartino, L. 2017. Insights into Genetic Distances of Pathogenic *Leptospira* spp. from Humans, Animals and Environment using Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) Genotypes. Journal of Zoonotic Diseases and Public Health 1:1.
52. Grune Loffler, S.; Martínez, M.; Romero, G.; Brihuega, B. 2017. Discriminación genotípica de serovariedades del serogrupo Icterohaemorrhagiae pertenecientes a *Leptospira interrogans* (Spirochaetales: Leptospiraceae) y el análisis de distancias génicas mediante coordenadas principales. FAVE Sección Ciencias Veterinarias, 15(1/2), 31-37. <https://doi.org/10.14409/favecv.v15i1/2.6243>
53. Grupo de leptospirosis. 2018. Guía del taller teórico práctico "Herramientas de diagnóstico molecular y tipificación genotípica de leptospiros". Centro de referencia OIE, Instituto de Patobiología-INTA. Buenos Aires, Argentina. 55 p.

54. Guglielmini, J.; Bourhy, P.; Schiettekatte, O.; Zinini, F.; Brisse, S.; Picardeau, M. 2019. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis* 13(4): e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>
55. Guindon, S.; Dufayard, J.F.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 59: 307-321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
56. Guindon, S.; Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52, 696-704.
57. Haake, D.; Levett, P. 2015. Leptospirosis in Humans. Capítulo 4. En: Adler, B. *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Volume 387, 295 p.
58. Haake, D.A.; Suchard, M.; Kelley, M.M.; Dundoo, M.; Alt, D.P.; Zuerner, R.L. 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J. Bacteriol*. 186: 2818-2828.
59. Haguenoer, E.; Baty, G.; Pourcel, C.; Lartigue, M.F.; Domelier, A.S.; Rosenau, A.; Quentin, R.; Mereghetti, L.; Lanotte, P. 2011. A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiol*. 11:171. doi: 10.1186/1471-2180-11-171
60. Hamer, M.; Saraullo, V.; Brihuega, B.; Watanabe, O.; Martínez, M.; Grune Löffler, S. 2019. Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias* 18:68-73; doi: <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>
61. Hamond, C.; Martins, G.; Loureiro, A.P.; Pestana, C.; Lawson-Ferreira, R.; Medeiros, M.A.; Lilienbaum, W. 2014. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet. Res. Commun*. 38: 81-85.
62. Harper, K.; Armelagos, G. 2010. The changing disease-scape in the third epidemiological transition. *Int J Environ Res Public Health* 7(2):675-697.
63. Hartskeerl, R.A.; Collares-Pereira, M.; Ellis, W.A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17, 494-501.
64. Henry, R.; Lo, M.; Khoo, C.; Zhang, H.; Boysen, R.I.; Picardeau, M.; Murray, G.L.; Bulach, D.M.; Adler, B. 2013. Iron precipitation on the surface of *Leptospira interrogans* is associated with mutation of the stress-response metalloprotease HtpX. *Appl. Environ. Microbiol*. 79:4653-4660.
65. International Leptospirosis Society (ILS) resources: (Disponinle: <https://www.leptosociety.org/resources> consultado: enero 2021).

66. Jones, B.; Grace, D.; Kock, R.; Alonso, S.; Rushton, J.; Said, M.; McKeever, D.; Mutua, F.; Young, J.; McDermott, J.; Pfeiffer, U. 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *PNAS* vol. 110, N.º 21: 8399-8404.
67. Jorge, S.; Hartleben, C.; Seixas, F.; Coimbra, M.; Stark, C.; Larrondo, A.; Amaral, M.; Albano, A.P.; Minello, L.F.; Dellagostin, O.A.; Brod, C.S. 2012. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. *Acta Tropica* 124 (2), 147-151.
68. Kargar, M.; Askari, A.; Doosti, A.; Ghorbani-Dalini, S. 2012. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis C virus. *Indian J Virol*, 23(1):18-23. doi: 10.1007/s13337-012-0067-2.
69. Katoh, K.; Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30: 772-80. doi: 10.1093/molbev/mst010.
70. King, A.M.; Bartpho, T.; Sermswan, R.W.; Bulach, D.M.; Eshghi, A.; Picardeau, M.; Adler, B.; Murray, G.L. 2013. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis, but requires a small chaperone, Lep, for stable expression. *Infect Immun* 81:2768-2776.
71. Koene, M.G.; Mevius, D.; Wagenaar, J.A. 2011. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.0365.
72. Koizumi, N.; Nakajima, C.; Harunari, T.; Tanikawa, T.; Tokiwa, T.; Uchimura, E.; Furuya, T.; Mingala, C.N.; Villanueva, M.A.; Ohnishi, M.; Suzuki, Y. 2012. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *J Clin Microbiol.* 50(6):2072-4. doi: 10.1128/JCM.00481-12
73. Kruy, S.L.; Van Cuyck, H.; Koeck, J.L. 2011. Multilocus variable number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(4):465-73.
74. Kwallah, A.O.; Inoue, S.; Muigai, A.W.; Kubo, T.; Sang, R.; Morita, K.; Mwau, M. 2013. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods.* 18. S0166-0934(13)00184-5. Doi. 10.1016/j.jviromet.2013.05.004.
75. Lambert, A.; Picardeau, M.; Haake, D.A.; Sermswan, R.W.; Srikram, A.; Adler, B.; Murray, G.A. 2012. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun* 80:2019-2025.
76. Lehman, J., Matthias, M.; Vinetz, J.; Fouts, D. 2014. Leptospiiral Pathogenomics. *Pathogens* 3:280-308. doi:10.3390/pathogens3020280.
77. Lehman, J.S.; Fouts, D.E.; Haft, D.H.; Cannella, A.P.; Ricaldi, J.N.; Brinkac, L.; Harkins, D.; Durkin, S.; Sanka, R.; Sutton, G.; Moreno, A.; Vinetz, J.M.; Matthias, A.M. 2013. Patho-

genomic inference of virulence-associated genes in *Leptospira interrogans*. PLoS Negl Trop Dis Oct 3;7(10):e2468. doi: 10.1371/journal.pntd.0002468

78. Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, 14:296-326.

789 Levett, P.; Morey, R.; Galloway, R.; Steigerwalt, A. 2006. *Leptospira broomii* sp. nov. isolated from humans with leptospirosis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:671-673.

80. Levett, P.N.; Morey, R.E.; Galloway, R.L.; Turner, D.E.; Steigerwalt, A.G.; Mayer, L.W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of Med Microbiology. 54:45-49.

81. Li, L.; Stoeckert, C.J.; Roos, D.S. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Res. 13: 2178-89. PMID: 12952885.

82. Li, S.J.; Zhang, C.C.; Li, X.W.; Tian, K.C.; Tang, G.P.; Wang, D.M.; Liu, Y.; Nie, Y.X.; Jiang, X.C. 2012. Molecular Typing of *Leptospira interrogans* strains Isolated from *Rattus tanezumi* in Guizhou Province, South West of China. Biomed. Environ. Sci. 25(5), 542-548.

83. Li-Fang, C.; Ting-Wen, C.; Yi-Ching, K.; Ming-Jeng, P.; Ya-Chung, T.; Cheng-Hsun, C.; Petrus, T.; Cheng-Chieh, H.; Chih-Wei, Y. 2014. Potential impact on kidney infection: a whole-genome analysis of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. Emerg Microbes Infect. Nov;3(11):e82. doi: 10.1038/emi.2014.78

84. Lilenbaum, W.; Varges, R.; Brandao, F.Z.; Cortez, A.; De Souza, S.O.; Brandao, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Vasconcellos, S.A. 2008. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology 69: 837-842.

85. Lilenbaum, W.; Monteiro, R.V.; Ristow, P.; Fraguas, S.; Cordoso, V.S.; Fedullo, L. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Research in Veterinary Science. 73 (3).

86. Llanes, A.; Restrepo, C.M.; Rajeev, S. 2016. Whole Genome Sequencing Allows Better Understanding of the Evolutionary History of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. PLoS ONE 11 (7): e0159387. doi:10.1371/journal.pone.0159387

87. Lloyd-Smith, J.O.; George, D.; Pepin, K.M.; Pitzer, V.E.; Pulliam, J.R.C.; Dobson, A.P.; Hudson, P.J.; Grenfell, B.T. 2009. Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interphase. Science 326: 1362. doi: 10.1126/science.1177345

88. Lo, M.; Murray, G.L.; Khoo, C.A.; Haake, D.A.; Zuerner, R.L.; Adler, B. 2010. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. Infect Immun 78:4850-4859.

89. Lourdault, K.; Cerqueira, G.M.; Wunder, E.A.M.P. 2011. Inactivation of clpB in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. Infect Immun 79:3711-3717.

90. Louvel, H.; Bommezzadri, S.; Zidane, N.; Boursaux-Eude, C.; Creno, S.; Magnier, A.; Rouy, Z.; Médigue, C.; Saint Girons, I.; Bouchier, C.; Picardeau, M. 2006. Comparative and

functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. Journal of Bacteriology 188: 7893-7904. doi: 10.1128/JB.00711-06

91.Lü, G.; Wei, X.; Wei, P.; Wang, X.; Lu, F. 2013. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus* in one food poisoning case. Wei Sheng Yan Jiu 42(5):814-7.

92.Luchini, D.; Meacci, F.; Oggioni, M.R.; Morabito, G.; D'Amato, V. 2008. Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. Int J Legal Med 122: 229-233. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0212-4>

93.Mair, G.; Vilei, E.M.; Wade, A.; Frey, J.; Unger, H. 2013. Isothermal loop-mediated amplification (lamp) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. BMC Vet Res. 27; 9:108. doi: 10.1186/1746-6148-9-108

94.Majed, Z.; Bellenger, E.; Postic, D.; Pourcel, C.; Baranton, G.; Picardeau, M. 2005. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. J Clin Microbiol 43, 539-545.

95.Marder, G.; Ruiz, R.; Bottinelli, O.; Peiretti, H.; Zorzo, L.; Merino, D.; Czernik, G. 2008. Prevalencia de leptospirosis en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Periodo mayo 2005-junio 2008. Revista Veterinaria 19(2),150-153.

96.Martin, U.; Sensevy, A.; Colombo, J.; Tramontin, V. 2002. Leptospirosis en la provincia de Santa Fe-Descripción epidemiológica, clínica y socioeconómica. Medicina 62, 164-168.

97.Matthias, M.A.; Ricaldi, J.N.; Cespedes, M.; Diaz, M.M.; Galloway, R.L.; Steigerwalt, A.G.; Patra, K.P.; Ore, C.V.; Gotuzzo, E.; Gilman, G.H.; Levett, P.N.; Vinetz, J.M. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. pLos Negl Trop Dis 2(4):e213. doi:10.1371/journal.pntd.0000213

98.McMichael, A.J. 2004. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: Past, present and future. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359 (1447):1049-1058.

99.Merien, F.; Amouriaux, P.; Perolat, P.; Baranton, G.; Saint, I. 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 30(9): 2219-2224.

100.Morse, S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Disease 1(1), 7-15.

101.Murray, G.; Morel, V.; Cerqueira, G.M.; Croda, J.; Srikram, A.; Henry, R.; Ko, A.I.; Dellagostin, O.A.; Bulach, D.M.; Sermiswan, R.W.; Adler, B.; Picardeau, M. 2009. Genome-Wide. Transposon Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species. Infection and immunity. Vol. 77, N.º 2, 810-816 pp. doi:10.1128/IAI.01293-08

102. Murray, G.; Morel, V.; Cerqueira, G.M.; Croda, J.; Srikram, A.; Henry, R.; Ko, A.I.; Dellagostin, O.A.; Bulach, D.M.; Sermswan, R.W.; Adler, B.; Picardeau, M. 2009. Genome-Wide Transposon Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species. *Infection and immunity*. Vol. 77, N.º 2, 810-816 pp. doi:10.1128/IAI.01293-08.
103. Nakao, R.; Morrison, L.J.; Zhou, L.; Magona, J.W.; Jongejan, F.; Sugimoto C. 2012. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid genotyping of *Ehrlichia ruminantium* and its application to infected *Amblyomma variegatum* collected in heartwater endemic areas in Uganda. *Parasitology*. 139(1):69-82.
104. Nascimento, A.; Verjovski-Almeida, S.; Van Sluys, M.A.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Camargo, L.E.A.; Digiampietri, L.A.; Harstkeerl, R.A.; Ho, P.L.; Marques, M.V.; Oliveira, M.C.; Setubal, J.C.; Haake, D.A.; Martins, E.A.L. 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Braz *J Med Biol Res*, Volume 37(4) 459-477. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400003>
105. Nascimento, A.L.; Ko, A.I.; Martins, E.A.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Ho, P.L.; Haake, D.A.; Verjovski-Almeida, S.; Hartskeerl, R.A.; Marques, M.V.; Oliveira, M.C.; Menck, C.F.; Leite, L.C.; Carrer, H.; Coutinho, L.L.; Degraeve, W.M.; Dellagostin, O.A.; El-Dorry, H.; Ferro, E.S.; Ferro, M.I.; Furlan, L.R.; Gamberini, M.; Gigliotti, E.A.; Góes-Neto, A.; Goldman, G.H.; Goldman, M.H.; Harakava, R.; Jerônimo, S.M.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.; Kimura, E.T.; Kuramae, E.E.; Lemos, E.G.; Lemos, M.V.; Marino, C.L.; Nunes, L.R.; De Oliveira, R.C.; Pereira, G.G.; Reis, M.S.; Schriefer, A.; Siqueira, W.J.; Sommer, P.; Tsai, S.M.; Simpson, A.J.; Ferro, J.A.; Camargo, L.E.; Kitajima, J.P.; Setubal, J.C.; Van Sluys, M.A. 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*, Apr;186(7):2164-2172.
106. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 32:268-74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
107. Nie, K.; Zhao, X.; Ding, X.; Li, X.D.; Zou, S.M.; Guo, J.F.; Wang, D.Y.; Gao, R.B.; Li, X.Y.; Huang, W.J.; Shu, Y.L.; Ma, X.J. 2013. Visual detection of human infection with influenza A (H7N9) virus by subtype-specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Clin Microbiol Infect*. doi: 10.1111/1469-0691.12263
108. Nogueira Di Azevedo, M.I.; Lilenbaum, W. 2020. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/lam.13442>
109. Notomi, T.; Okayama, H.; Masbuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28:E63.
110. OIE (World Organization for Animal Health). 2014. *Leptospirosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. OIE, Paris.
111. OIE, 2020. (Disponível: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2020/> consultado: enero 2021).

- 112.OMS. 2020. (Disponibile: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses> consultado: diciembre 2020).
- 113.Pavan, M.E.; Brihuega, B.; Pettinari, M.J.; Cairó, F. 2011. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 43,251-255.
- 114.Pavan, M.E.; Cairó, F.; Pettinari, M.J.; Samartino, L.; Brihuega, B. 2011b. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34(2): 135-41.
- 115.Pavan, M.; Cairo, F.; Brihuega, B.; Samartino, L. 2008. Múltiple-locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comp Immun Microbiol & Infec Diseases*, 31 (1) 37-45.
- 116.Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* 6, 288-295.
- 117.Perez, J.; Brescia, F.; Becam, J.; Mauron, C.; Goarant, C. 2011. Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caleodonia. *PLoS Neglected Tropical Disease* 5(10): e1361. doi:10.1371/journal.pntd.0001361
- 118.Perolat, P.; Chappel, R.J.; Adler, B.; Baranton, B.; Bulach, D.M.; Billinghamurst, M.L.; Lecocart, M.; Merien, F.; Serrano, M.S. 1998. *Leptospira fainei* sp.nov. isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol* 48,3: 851-8.
- 119.Phetsuksiri, B.; Rudeeaneksin, J.; Srisungngam, S.; Bunchoo, S.; Roienthong, D.; Mukai, T.; Nakajima, C.; Hamada, S.; Suzuki, Y. 2013. Applicability of In-House Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Grown on Solid Media. *Jpn J Infect Dis.* 66(3):249-51.
- 120.Picardeau, M.; Bulach, D.M.; Bouchier, C.; Zuerner, R.L.; Zidane, N.; Wilson, P.J.; Creno, S.; Kuczek, E.S.; Bommezzardi, S.; Davis, J.C.; McGrath, A.; Johnson, M.J.; Bour-saux-Eude, C.; Seemann, T.; Rouy, Z.; Coppel, R.L.; Rood, J.L.; Lajus, A.; Davies, J.K.; Méciqque, C.; Adler, B. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 13, 3(2):e1607. doi:10.1371/journal.pone.00001607
- 121.Picardeau, M.; Bulach, D.M.; Bouchier, C.; Zuerner, R.L.; Zidane, N.; Wilson, P.J.; Creno, S.; Kuczek, E.S.; Bommezzardi, S.; Davis, J.C.; McGrath, A.; Johnson, M.J.; Bour-saux-Eude, C.; Seemann, T.; Rouy, Z.; Coppel, R.L.; Rood, J.L.; Lajus, A.; Davies, J.K.; Méciqque, C.; Adler, B. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 13, 3(2):e1607. doi:10.1371/journal.pone.00001607
- 122.Picardeau, M. 2007. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiology* vol 15: 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

123. Picardeau, M. 2015. Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. En: Adler, B. (ed.). *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 387, 295 p.
124. 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. Mol. Microbiol. 40 (1): 189-99.
125. Podgorsek, D.; Ruzic-Sabljić, E.; Logar, M.; Pavlović, A.; Remec, T.; Baklan, Z. 2020. Evaluation of the real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of *Leptospira* infection. BMC Microbiology 20:59. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>
126. Position Statement – Speciation of Leptospiral Isolates International Leptospirosis Society – Taxonomic Subcommittee 2018 (Disponibile: https://drive.google.com/file/d/1gYCph8eRuV3uUEnGi65_sx3MUpl8ShV/view consultado: 22/07/2021).
127. Powell, S.; Szklarczyk, D.; Trachana, K.; Roth, A.; Kuhn, M. 2012. eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. Nucleic Acids Res 2012;40:D284-D289.
128. Puche, R.; Ferres, I.; Caraballo, L.; Rangel, Y.; Picardeau, M.; Takiff, H.; Iraola, G. 2018. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. Int J Syst Evol Microbiol. Feb;68(2):513-517. doi: 10.1099/ijsem.0.002528
129. Ralph, D.; McClelland, M. 1994. Phylogenetic evidence for horizontal transfer of an intervening sequence between species in a spirochete genus. J. Bacteriol. 176:5982-5987.
130. Rawlins, J.; Portanova, A.; Zuckerman, I.; Loftis, A.; Ceccato, P.; Willingham A.L.; Verma, A. 2014. Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on st. Kitts. Int J Environ Res Public Health 11: 7953-7960. <https://doi.org/10.3390/ijer-ph110807953>
131. Ricaldi, J.N.; Fouts, D.E.; Selengut, J.D.; Harkins, D.M.; Patra, K.P.; Moreno, A.; Lehmann, J.S.; Purushe, J.; Sanka, R.; Torres, M.; Webster, N.J.; Vinetz, J.M.; Michael, A.; Matthias, M.A. 2012. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. PLoSNegl Trop Dis 6(10): e1853. doi:10.1371/journal.pntd.0001853
132. Rivera, W.L.; Ong, V.A. 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Entamoeba histolytica*. Asian Pac J Trop Med. 6(6):457-61. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60074-7
133. Rojas, R.; Monahan, A.M.; Schuller, S.; Miller, I.S.; Markey, B.K.; Nally, J.E. 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis. 29:1305-1309.
134. Rossetti, C.A.; Vanasco, B.N.; Pini, N.; Carfagnini, J.C.; 2004. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). Pesq. Vet. Bras. 24 (1) 6-10.

- 135.Saito, M.; Miyahara, S.; Villanueva, S.Y.; Aramaki, N.; Ikejiri, M. 2014. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* from coastal soil in Leyte, Philippines after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). *Appl Environ Microbiol* 80: 6926-6932. <https://doi.org/10.1128/AEM.02568-14>
- 136.Salaün, L.; Mérien, F.; Gurianova, S.; Baranton, G.; Picardeau, M. 2006. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 44, 3954-3962.
- 137.Scialfa, E.; Bolpe, J.; Bardón, J.C.; Ridao, G.; Gentile, J.; Gallicchio, O. 2010. Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología* 42:126-128.
- 138.Scialfa, E.; Grune, S.; Brihuega, B.; Aguirre, P.; Rivero, M. 2018. Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Rev. Arg. Micro.* 50(3):323-6.
- 139.Seemann, T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 15:2068-9.
- 140.Seijo, A.; Coto, H.; San Juan, J.; Videla, J.; Deodato, B.; Cernigoi, B.; Messina, O.G.; Collia, O.; De Bassadoni, D.; Shtirbu, R.; Olenchuk, A.; De Mazzonelli, G.D.; Parma, A. 2002. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*, Sep;8(9):1004-5.
- 141.Seijo, A. 2015. Atlas de Zoonosis y enfermedades emergentes. 1.^a edición. Edición Fundación Mundo Sano.
- 142.Senevirathna, I.; Jayasundara, D.; Joshua, P.; Lefler, K.; Chaiboonm, L.; Warnasekara, J.; Agampodi, S.; Matthias, M.A.; Vinetz, J.M. 2020. Complete Genome Sequence of *Leptospira interrogans* Strains FMAS_KW1, FMAS_KW2 and FMAS_AW1 Isolated from Leptospirosis Patients from Karawanalla and Awissawella, Sri Lanka. *Journal of Genomics*, Vol. 8 49-52. doi: 10.7150/jgen.43953
- 143.Servicio Meteorológico Nacional. 2017. Revista Meteoros. Precipitaciones Año 09 | N.º 4. <http://repositorio.smn.gov.ar/bitstream/handle/20.500.12160/1188/MET09-4.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 144.Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J.D.; Higgins, DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.*; 7:539. doi: 0.1038/msb.2011.75
- 145.Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 32-SE 17-2010.
- 146.Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 177-SE 26-2013.
147. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 395-SE 03-2018.

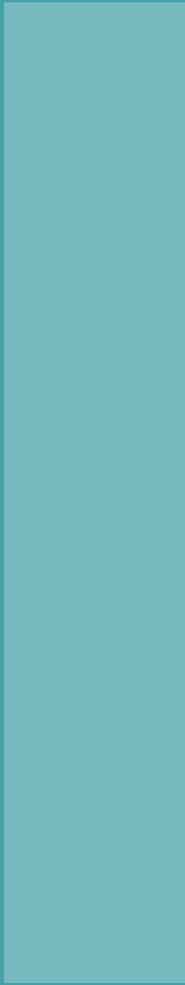
148. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 341-SE 52- 2016.
149. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 79-SE 20- 2011.
150. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 1 6 5-SE 13-2013.
151. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 140 SE 40-2012.
152. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 214-SE20-2014.
153. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 263-SE 24 2015.
154. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS-C2/SIVILA publicado en el Boletín integrado n.º 443- SE 210-2015.
155. Slack, A.; Galloway, R.; Symonds, M.; Dohnt, M.; Smythe, L. 2009. Reclassification of *Leptospira meyeri* serovars Perameles to *Leptospira interrogans* serovar Perameles through serological and molecular analysis: evidence of a need for changes to current procedures in *Leptospira* taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1199-1203.
156. Slack, A.; Symonds, M.; Dohnt, M.; Smythe, L. 2006. An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.* 55,1549-57.
157. Sonthayanon, P.; Chierakul, W.; Wuthiekanun, V.; Thaipadungpanit, J.; Kalam-baheti, T.; Boonsilp, S.; Amornchai, P.; Smythe, L.D.; Limmathurotsakul, D.; Day, N.P.; Peacock, S.J. 2011. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 84(4):614-20. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0473.
158. Sonthayanon, P.; Chierakul, W.; Wuthiekanun, V.; Thaipadungpanit, J.; Kalam-baheti, T.; Boonsilp, S.; Amornchai, P.; Smythe, L.D.; Limmathurotsakul, D.; Day, N.P.; Peacock, S.J. 2011. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 84(4):614-20. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0473.
159. Späth, E.; Becker, B. 2012. Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. Grupo de Sanidad Animal INTA. Boletín N.º 160 (Disponible: <https://inta.gob.ar/documentos/analisis-epidemiologico-de-8-anos-de-disgnosticos-de-enfermedades-de-los-bovinos> consultado: 22/07/2021).

160. Stanchi, N.; Brihuega, B.; Gatti, E. 2007. Leptospirosis. En: Stanchi, N.; Martino, P., Gentilini, G.; Reinoso, Echeverría, M., Leardini, N., Copes, J.A.; (ed.). Microbiología Veterinaria. Intermédica, Buenos Aires, Argentina. 320-325 pp.
161. Sterling, C.R.; Thiermann, A.B. 1981. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet Pathol*, 18:628-637.
162. Suwancharoen, D.; Kulchim, C.; Chirathaworn, C.; Yoshida, S. 2012. Development of a novel primer combination to detect pathogenic *Leptospira* by loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol Methods*. 91(1):171-3. doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.008
163. Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
164. Talavera, G.; Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56: 564-577.
165. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
166. Ulrich, L.E.; Zhulin, I.B. 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* 38:401-407.
167. UN-Environment transmission programme. 2020. Preventing the next pandemic. Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission. 82 p.
168. Vallenet, D.; Labarre, L.; Rouy, Z.; Barbe, V.; Bocs, S.; Lajus, A.; Pascal, G.; Scarpelli, C.; Médigue, C. 2006. MaGe – a microbial genome annotation system supported by synteny result. *Nucleic Acids Research* 34: 53-65.
169. Van Cuyck, H.; Pichon, B.; Leroy, P.; Granger-Farbos, A.; Underwood A.; Soullié, B.; Koeck, J.L. 2012. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with multiple loci sequence typing. *BMC Microbiol.* 12:241.
170. Varni, V.; Koval, A.; Nagel, A.; Ruybal, P.; Caimi, K.; Amadio, A.F. 2016. First genome sequence of *Leptospira interrogans* serovar Pomona, isolated from a bovine abortion. *Genome Announc* 4(3):e00345-16. doi:10.1128/genomeA.00345-16
171. World Health Organization (WHO). 2020. (Disponibile: https://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/zoonotic_diseases_list/en/ consultado: enero de 2021).
172. World Health Organization (WHO). 2010. Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. WHO Press, Geneva, Suiza. 40 p.
173. Xie, J.; Liu, G., Tian, Z.; Luo, J. 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Theileria equi*. *Acta Trop.* doi:pii: S0001-706X(13)00133-2. 10.1016/j.actatropica.2013.05.007

174. Xu, C.; Loftis, A.; Ahluwalia, S.K.; Gao, D.; Verma, A.; Wang, C.; Kaltenboeck, B. 2014. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. *PLoS ONE* 9: e89507.
175. Xu, Y.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Chang, Y.F.; Zhang, Y.; Jiang, X.; Zhuang, X.; Zhu, Y.; Zhang, J.; Zeng, L.; Yang, M.; Li, S.; Wang, S.; Ye, Q.; Xin, X.; Zhao, G.; Zheng, H.; Guo, X.; Wang, J. 2016. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci. Rep.* 6, 20020; doi: 10.1038/srep20020
176. Yasuda, P.H.; Steigerwalt, A.G.; Sulzer, K.R.; Kaufmann, A.F.; Rogers, F.; Brenner, D.J. 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.
177. Zamora, M.V.; Riedeman, M.V. 1999. Animales silvestres como reservorio de leptospirosis en Chile-Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina veterinaria*, v. 31, n.º 2.
178. Zhang, K.; Murray, G.L.; Seemann, T.; Srikrum, A.; Bartpho, T.; Sermswan, R.W.; Adler, B.; Hoke, D.E. 2013. Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian Apolipoprotein A-I. *Infect Imm* 8:3872-3879.
179. Zhang, X.; Hai, R.; Wei, J.; Cui, Z.; Zhang, E.; Song, Z.; Yu, D. 2009. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiol.* 9:205.
180. Zuerner, R.; Alt, D.P.; Palmer, M.; Thacker, T.C.; Olsen, S.C. 2011. *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo vaccine induces Th1 Response, Activates NK Cells and Reduces Colonization. *Clinical and vaccine immunology*. Vol. 18 (4): 684-69.



ANEXOS



Anexo A.

A.7

Tabla de repeticiones SALAUN

<i>L. interrogans</i>											
Locus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VNTR 4	425	459	493	527	561	595	629	663	697	731	765
VNTR 7	299	345	391	437	483	529	575	621	667	713	759
VNTR 10	420	466	512	558	604	650	696	742	788	834	880
VNTR Lb4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VNTR Lb5	668	707	746	785	824	863	902	941	980	1019	1058
<i>L. kirschneri</i>											
Locus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VNTR 4	425	459	493	527	561	595	629	663	697	731	765
VNTR 7	299	345	391	437	483	529	575	621	667	713	759
VNTR 10	347	393	439	485	531	577	623	669	715	761	807
VNTR Lb4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VNTR Lb5	668	707	746	785	824	863	902	941	980	1019	1058
<i>L. borgpetersenii</i>											
Locus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VNTR 4	425	459	493	527	561	595	629	663	697	731	765
VNTR 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VNTR 10	333	379	425	471	517	563	609	655	701	747	793
VNTR Lb4	573	633	693	753	813	873	933	993	1053	1113	1173
VNTR Lb5	722	758	794	830	866	902	938	974	1010	1046	1082

A.2

Tabla de repeticiones MAJED

<i>L. interrogans</i>																
Locus	Lai	bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VNTR 4	362	192	226	260	294	328	362	396	430	464	498	532	566	600	634	668
VNTR 7	304	166	212	258	304	350	396	442	488	534	580	626	672	718	764	810
VNTR 9	381	197	243	289	335	381	427	473	519	565	611	657	703	749	795	841
VNTR 10	239	149	194	239	284	329	374	419	464	509	554	599	644	689	734	779
VNTR 19	421	139	186	233	280	327	374	421	468	515	562	609	656	703	750	797
VNTR 23	339	109	155	201	247	293	339	385	431	477	523	569	615	661	707	753
VNTR 31	671	363	440	517	594	671	748	825	902	979	1056	1133				

ANEXO B

Tabla publicada en Grune, 2014. Genotipos determinados durante este estudio, incluyendo las cepas aisladas durante el periodo de 2010-2013, las cepas pertenecientes a la colección del cepario y las cepas aisladas por la División de Zoonosis Rurales de Azul.

Genotipo mediante MLVA	Número de cepas	Nombre de la cepa	Origen	Localidad y fecha de la cepa aislada	Cepario	Aislada (2010-2013)
<i>L. borgpetersenii</i> , Ballum serovar Castellonis Castellon 3 (1,-,1,6,7)	1	Rat 1	<i>Rattus</i> sp.	Buenos Aires, 2010		x
	1	MusC16	<i>Mus musculus</i>	Buenos Aires, año desconocido	x	
	8	Santa Fe I a Santa Fe VIII	<i>Mus musculus</i>	Santa Fe, 1998	x	

Genotipo mediante MLVA	Número de cepas	Nombre de la cepa	Origen	Localidad y fecha de la cepa aislada	Cepario	Aislada (2010-2013)
	5	ROE 1 a ROE 5	<i>Rattus rattus</i>	Paraná, 2006	x	
	1	Jabalí	<i>Sos scrofa</i>	Patagonia, 2009		x
	1	Mus441	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Buenos Aires, 2012		x
	1	Rat432	<i>Rattus rattus</i>	Buenos Aires, 2012		x
	1	Com345	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	Buenos Aires, 2012		x
	1	Rocamora	<i>Ovis aries</i>	Rocamora, 1961	x	
Total	20					

L. interrogans
Canicola serovar
Canicola Hond
Utrecht IV (1,10,
2, 3, 10, 2,3)

	1	Ardilla	<i>Callosciurus erythraeus</i>	Luján, 2011		x
	1	Zorrino	<i>Conepatus chinga</i>	Azul, 2011		x
	1	Com	<i>Didelphis albiventris</i>	Buenos Aires, 2009	x	
	1	Com2	<i>Didelphis albiventris</i>	Buenos Aires, 2010		x
	1	Roedor 104	<i>Rattus norvegicus</i>	Buenos Aires, 2011		x
	1	Bocan	<i>Bos taurus</i>	Buenos Aires, 2011		x
Total	6					

L. interrogans
Canicola serovar
Portlandvere MY
1039 (1,10, 2, 3,
10, 2,4)

	1	Roedor 1507	<i>Rattus norvegicus</i>	Buenos Aires, 2011		x
	2	Corrientes 289, Corrientes 266	<i>Bos taurus</i>	Corrientes, 2010		x
Total	3					

Genotipo mediante MLVA	Número de cepas	Nombre de la cepa	Origen	Localidad y fecha de la cepa aislada	Cepario	Aislada (2010-2013)
<i>L. interrogans</i> Icterhaemorrhagiae serovar Icterohaemorrhagiae RGA (2,1,7,-4)						
	5	Rat 102; Rat 302; Rat 454; Rat 451; Rat 495;	<i>Rattus norvegicus</i>	Buenos Aires, 2012		x
	1	Ardilla2	<i>Callosciurus erythraeus</i>	Luján, 2011		x
	5	Rat 5, Rat6, Rat7, Rat8, Rat9,	<i>Rattus norvegicus</i>	Azul, 2011		x
Total	11					
<i>L. interrogans</i> Icterhaemorrhagiae serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (2,1,7,-,6)						
	5	Rat101, Rat103, Rat298, Rat410, Rat478	<i>Rattus norvegicus</i>	Buenos Aires, 2012		x
	5	Rat1A, Rat2A, Rat3A, Rat13, Rat17	<i>Rattus norvegicus</i>	Azul, 2011		x
	1	Mus320	<i>Oligoryzomys nigris</i>	Delta, 2012		x
	3	Com3 Com4	<i>Didelphis albiventris</i>	Azul, 2011		x
Total	13					
<i>L. interrogans</i> Pomona serovar Pomona (2,0,6,14,8,1,3)						
	1	Balcarce1	<i>Bos taurus</i>	Balcarce, 2011		x
Total	1					

Genotipo mediante MLVA	Número de cepas	Nombre de la cepa	Origen	Localidad y fecha de la cepa aislada	Cepario	Aislada (2010-2013)
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae serovar Icterohaemorrhagiae (2,1,13,7,2,0,3)						
	1	RatK4	<i>Rattus</i> sp.	Buenos Aires, 1961	x	
	1	RatK5	<i>Rattus</i> sp.	Buenos Aires, 1963	x	
	3	Rat2, Rat3, Rat4	<i>Rattus norvegicus</i>	Buenos Aires, 2010		x
	1	Balcarce2	<i>Bos taurus</i>	Balcarce, 2013		x
	1	Entre Ríos	<i>Bos taurus</i>	Entre Ríos, 2013		x
Total	7					
Similar a <i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae serovar Icterohaemorrhagiae (2,1,10,7,2,0,3)						
	1	Zorro	<i>Lycalopex griseus</i>	Azul, 2011		x
Total	1					
Similar a <i>L. interrogans</i> Grip-potyphosa Muelleri serovar RM2 (2,3,6,7,1,6,3)						
	1	RatBA	<i>Rattus</i> sp.	Buenos Aires, 1980		
Total	1					
<i>L. interrogans</i> similar Pyrogenes						
(2,10,11,6,14,8,5)	1	Cuis	<i>Microcavia australis</i>	Buenos Aires, 1963.	x	
(3,10,11,6,14,8,8)	1	Peludo	<i>ChaetophRACTUS villosus</i>	Buenos Aires, 1969	x	
Total	2					
Total de cepas tipificadas por MLVA	65					

Este manual es una recopilación sobre las herramientas moleculares de diagnóstico y caracterización de cepas aisladas. Este trabajo es resultado de la integración de más de 10 años de trabajo durante mi tesis doctoral y posdoctorado en esta temática. Todo el trabajo fue realizado en el Laboratorio de Leptospirosis, laboratorio de referencia de la OIE (referato compartido con SENASA), ubicado en el Instituto de Patobiología-IPVET perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), del INTA. El grupo de trabajo está conformado por dos investigadoras más (Dra. Bibiana Brihuega y Dra. Mara Martínez) y actualmente tres becarias doctorales (Lic. Vanina Saraullo, Bioq. Micaela Hamer y Vet. Olivia Watanabe). Este manual brinda en detalle los protocolos aplicados al diagnóstico molecular y caracterización del género *Leptospira* spp., en especial al grupo de las cepas pertenecientes a las especies patógenas. Los anexos presentados en este manual brindan información adicional representando el fruto de los años trabajados y sirve para profundizar la aplicación de las herramientas descritas en este trabajo. Este manual está dirigido a estudiantes y profesionales jóvenes que quieran incursionar en la investigación de este agente zoonótico, de importancia mundial y endémico en muchos países. La intención de este manual es incentivar en aplicar conceptos novedosos a problemáticas actuales e innovar en la respuesta de soluciones para la población, desarrollando herramientas diagnósticas veraces, fáciles de interpretar y de resultado rápido.

ISBN 978-987-679-325-4



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina