



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN DE MARCADORES
GENÉTICOS PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN DE *Leptospira*
spp. PATÓGENA EN MUESTRAS DE
RESERVORIOS DE BELÉN-IQUITOS.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ANIKA GUADALUPE ECA AVILA

LIMA-PERÚ

2018

ASESORA: Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo.

A mi madre y hermanas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Dra. Katherine Torres por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis y por la paciencia que siempre mantuvo en todo momento y bajo diversas circunstancias.

Tambien agradezco a mis compañeros de laboratorio, Karen y Gerardo, que supieron aconsejarme y ayudarme, haciendo valioso el tiempo que pasé durante mi estancia ahí, y enseñándome lo que verdaderamente es trabajar en equipo.

Por otro lado, agradezco profundamente a mis colegas y amigos de la maestría, que fueron mi apoyo académico, emocional y mi compañía en todo momento: Danitza Dávila, Karen Ocampo, Carlos Acevedo, Josmell Sevillano, Gerardo Díaz y Luis Cabrera.

Finalmente, agradezco a mi familia, por creer en mí SIEMPRE.

Anika Eca Avila

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Los estudios de maestría y los gastos de investigación fueron financiados con un aporte de FONDECYT, de conformidad al Convenio de Gestión No 031-2015-FONDECYT.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
III. MARCO TEÓRICO.....	7
III.1. Leptospirosis.....	7
III.2. <i>Leptospira</i>	8
III.3. Clasificación taxonómica de <i>Leptospira</i>	10
III.3.2. Clasificación molecular.....	10
III.3.3. Especie y serovariedad.....	11
III.4. Características genómicas de las especies de <i>Leptospira</i>	13
III.5. Características del ciclo de vida y el hospedero.....	15
III.6. Relación serovar-hospedero.....	17
III.7. Leptospirosis en Perú.....	20
III.8. Diagnóstico y tipificación serológica de <i>Leptospira</i>	22
III.8.1. Prueba de oro: Microaglutinación (MAT).....	23
III.8.2. Puebas de tamizaje y diagnóstico.....	24
III.9. Tipificación de serovariedades de <i>Leptospira</i> mediante métodos moleculares.....	25

III.9.1. Tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST).....	25
III.9.2. Tipificación mediante el análisis de melting de alta resolución (HRM).....	26
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	33
V. OBJETIVOS.....	35
VI. METODOLOGÍA.....	36
VI.1. Diseño del estudio.....	36
VI.2. Población de estudio	37
VI.3. Colecta y procesamiento de la muestra de orina.....	38
VI.4. Procedimientos y técnicas.....	41
VI.4.1 Selección de genes marcadores y diseño de cebadores.....	41
VI.4.1.1. Identificación de mutaciones silenciosas en marcadores...	43
VI.4.1.2. Diseño de cebadores.....	43
VI.4.2. Extracción y purificación del ADN.....	44
VI.4.3. Estandarización del análisis HRM en cepas de referencia de <i>Leptospira</i> spp.....	45
VI.4.3.1. Identificación de la temperatura óptima de hibridación de los cebadores.....	45
VI.4.3.2. Determinación de perfiles de <i>melting</i> en cepas de referencia.....	46

VI.4.3.2.1. Generación de <i>clusters</i>	46
VI.4.3.3. Sensibilidad del de <i>High Resolution Melting</i>	48
VI.4.4. Caracterización de serovariedades de <i>Leptospira</i> en muestras de orina de perros y cerdos mediante un sistema HRM.....	48
VI.4.4.1. Identificación de muestras positivas a <i>Leptospira</i> patógenas mediante la detección del gen <i>lipL32</i>	49
VI.4.4.1.1. Determinación de la sensibilidad de la detección de gen <i>lipL32</i> en orina de perro y cerdo.....	49
VI.4.4.1.2. Detección del gen <i>lipL32</i> en muestras de orina de perros y cerdos.....	50
VI.4.4.2. Determinación de los perfiles de <i>melting</i> en muestras mediante HRM.....	51
VI.4.5. Secuenciamiento de las muestras genotipificadas por HRM....	52
VI.5. Análisis Estadístico.....	52
VI.5.1. Determinación de los parámetros de eficiencia del análisis en cepas de referencia y muestras.....	52
VII. RESULTADOS.....	54
VII.1. Colecta de muestras y descripción de la población de estudio....	54
VII.2. Selección de genes marcadores.....	56
VII.2.1. Identificación de mutaciones silenciosas en los	

marcadores <i>lipL32</i> , <i>secY</i> y <i>lpxC</i>	62
VII.3. Estandarización del análisis HRM en cepas de referencia de <i>Leptospira</i> sp.	68
VII.3.1. Identificación de la temperatura óptima de hibridación.....	69
VII.3.2. Determinación de perfiles de <i>melting</i> en cepas de referencia..	69
VII.3.3. Sensibilidad del <i>Análisis de Melting de Alta Resolución</i> <i>(HRM)</i>	77
VII.3.4. Parámetros de eficiencia del análisis HRM.....	80
VII.4. Caracterización de serovariedades de <i>Leptospira</i> en muestras de orina de perros y cerdos mediante un sistema HRM.....	81
VII.4.1. Identificación de muestras positivas a <i>Leptospira</i> sp. patógena.....	82
VII.4.2. Determinación de los perfiles de <i>melting</i> en muestras de orina mediante HRM.....	85
VIII. DISCUSIÓN.....	91
IX. CONCLUSIONES.....	106
X. LIMITACIONES.....	107
XI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	108
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
XIII. ANEXO.	

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1: Presentación clínica de la leptospirosis.....	8
Figura 2: Características morfológicas de <i>Leptospira</i>	9
Figura 3: Filogenia de <i>Lepstospira</i>	12
Figura 4: Clasificación de <i>Leptospira</i> por hibridación ADN/ADN.....	12
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Leptospira</i>	17
Figura 6: Leptospirosis en Perú según el MINSA.....	21
Figura 7: Tendencia de los casos notificados entre el 2016-2017 por inundaciones y huaycos. Fuente: MINSA.....	22
Figura 8: Curva de <i>melting</i> de baja resolución.....	28
Figura 9: Curva pre y post <i>melting</i>	30
Figura 10: Curva normalizada.....	31
Figura 11: Curva de diferencias de <i>melting</i>	32
Figura 12: Diseño del estudio.....	37
Figura 13: Esquema de colecta y procesamiento de las muestras.....	40
Figura 14: Esquema de identificación de marcadores y diseño de cebas- dores.....	41
Figura 15: Esquema del sistema HRM para la genotipificación de	

<i>Leptospira</i>	49
Figura 16: Muestreo en el sector 20 de Belén.....	55
Figura 17. Alineamiento del gen <i>lipL32</i>	60
Figura 18. Análisis filogenético de especies de <i>Leptospira</i> basado en el gen <i>lipL32</i>	61
Figura 19. Perfil de <i>melting</i> usando el marcador <i>lipL32</i>	68
Figura 20. Árbol filogenético generado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los <i>clusters</i> generados mediante <i>High Resolution Melting</i> con el gen <i>lipL32</i> ..	74
Figura 21. Árbol filogenético generado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los <i>clusters</i> generados mediante <i>High Resolution Melting</i> con el gen <i>lpxC</i>	75
Figura 22. Árbol filogenético generado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los <i>clusters</i> generados mediante <i>High Resolution Melting</i> con el gen <i>secY</i>	76
Figura 23. Perfil de la cepa M20 inoculada en orina de perro y cerdo.....	78
Figura 24. Gel de electroforesis de muestras positivas a <i>Leptospira</i> patógena	84
Figura 25. Distribución de las muestras positivas a <i>Leptospira</i> patógena en el sector 20 del distrito de Belén.....	85
Figura 26. Árbol filogenético de <i>lipL32</i> con cepas de referencia y muestras...	88

Figura 27. Árbol filogenético de <i>lpxC</i> con cepas de referencia y muestras.....	89
Figura 28. Árbol filogenético de <i>secY</i> con cepas de referencia y muestras.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág</i>
Tabla 1: Funciones y características de los genes marcadores para HRM.....	42
Tabla 2 : Datos obtenidos de las muestras colectadas.....	56
Tabla 3: Anàlisis de formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores.....	58
Tabla 4: Cebadores diseñados para el ensayo de <i>High Resolution Melting</i>	59
Tabla 5: Tabla de mutaciones silenciosas, marcador <i>lipL32</i>	63
Tabla 6: Tabla de mutaciones silenciosas, marcador <i>lpxC</i>	64
Tabla 7: Tabla de mutaciones silenciosas, marcador <i>secY</i>	66
Tabla 8: Porcentajes de confianza de los <i>clusters</i> obtenidos con el marcador <i>lipL32</i>	70
Tabla 9: Resumen de los <i>clusters</i> generados con seis marcadores y perfil de <i>melting</i> obtenido a partir de <i>lipL32</i> , <i>secY</i> y <i>lpxC</i>	71
Tabla 10. Perfil de <i>melting</i> obtenido a partir de <i>lipL32</i> , <i>secY</i> y <i>lpxC</i> a una concentración de ADN de 10 ng/μL.....	73
Tabla 11. Valores de sensibilidad de los cebadores usados en HRM y para detección de <i>Leptospira</i> spp. patógena.....	79
Tabla 12. Parámetros de eficiencia y diversidad de los genes marcadores para HRM.....	80
Tabla 13. Muestras de perros positivas a la detección de <i>Leptospira</i> sp. patógena.	82

Tabla 14. Muestras de cerdos positivas a la detección de <i>Leptospira</i> sp. patógena. Valores de sensibilidad de los cebadores usados en HRM y para detección de <i>Leptospira</i> spp. patógena.....	83
Tabla 15. Genotipos identificados en las muestras de perros (EP) y cerdos (EC).....	87

RESUMEN

La leptospirosis es una de las zoonosis más distribuidas a nivel mundial, y en el Perú ha cobrado mucha importancia en la salud pública debido al aumento en la prevalencia de la enfermedad en la región amazónica, sin embargo, su diagnóstico es complicado ya que sus manifestaciones clínicas son inespecíficas y muy variables. Por esta razón se necesita de la implementación de nuevas técnicas de diagnóstico que sean rápidas y efectivas, que sirvan para la construcción de la epidemiología de la enfermedad y faciliten el seguimiento del riesgo en animales reservorios, identificando qué serovariedades albergan de modo que se puedan crear vacunas eficientes que eviten brotes futuros de Leptospirosis. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar una sistema basado en *melting* de alta resolución (HMR, por sus siglas en inglés) para la identificación de subespecies patógenas de *Leptospira* presentes en muestras de orina de perros y cerdos provenientes del sector 20 en el distrito de Belén-Iquitos, para ello, se colectaron 63 muestras orina de perros domésticos y 88 muestras de orina de cerdos provenientes camales clandestinos. Luego se seleccionaron los genes marcadores *lipL32*, *lpxC*, *secY*, *ompL1* y *wzy* para el análisis de *melting*, debido a sus propiedades antigénicas, sin embargo sólo los tres primeros se utilizaron para la genotipificación de *Leptospira* por el alto poder discriminatorio (DI=0.94) que se conseguía al utilizarlos en simultáneo en 19 cepas de referencia de *Leptospira* patógena, además los tres presentaron un valor de sensibilidad de 10^1 bacteria/ μ L y eficiencia de tipificación mayor al 85%. La reproducibilidad del HRM fue de 100% y el porcentaje de confianza de los *clusters* generados fue mayor al 90%. El sistema de genotipificación en las muestras inició con la detección de aquellas

que albergaban *Leptospira* patógena, utilizando el gen *lipL32* en un PCR cuantitativo, donde se obtuvo 14 muestras positivas en perros y 13 en cerdos. Luego se determinó el genotipo en las muestras por comparación con los genotipos que se determinaron en las cepas de referencia, obteniéndose que 11 de las muestras de perros correspondían a al genotipo 2, dentro del cual se encuentran las serovariedades: *L. interrogans Australis Australis Ballico*, *L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami*, *L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman* y *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20* y una pertenecía a la serovariedad *L. kirschneri Grippatyphosa Grippatyphosa Moskava V*. En cerdos también se identificaron muestras pertenecientes al genotipo 2, sin embargo, cuatro pertenecían a la especie *L. santarosai*, y dos a las especies *L. kirschneri* y *L. noguchii*. Finalmente los genotipos fueron determinados por el sistema fueron verificados mediante secuenciamiento y se encontró que todos perfiles de *melting* obtenidos correspondían a un genotipo específico. En conclusión se reporta por primera vez un sistema de genotipificación de subespecies patógenas de *Leptospira* spp. realizado directamente de muestras de orina de perros y cerdos (potenciales reservorios) con un alto poder discriminatorio, además se reportan tres especies (*L. santarosai*, *L. kirschneri* y *L. noguchii*) que no han sido identificadas en cerdos hasta la fecha.

Palabras clave: *Leptospira* spp., HRM, diagnóstico, genotipificación.

ABSTRACT

Leptospirosis is widely prevalent in the Peruvian Amazon. Animal reservoirs contaminating water sources likely drive seasonal outbreaks of severe human leptospirosis. Knowing animal isolate genotypes would help us understand the transmission dynamics of leptospirosis in this environment. Culturing *Leptospira* from animals is challenging in this setting, so we aimed to develop a genotyping system based on High Resolution Melting (HRM) for the identification of pathogenic subspecies of *Leptospira*, directly from animal urine samples from a flood-prone area of Belen, Iquitos, Peru.

HRM profiles of 19 *Leptospira* reference strains were determined using *lipL32*, *lpxC* and *secY* marker genes. Urine samples were collected from 63 dogs and 88 pigs from homes and a unlicensed slaughterhouse, and assayed using *lipL32*-qPCR to detect pathogenic *Leptospira*. Genotypes of DNA in positive samples were determined by HRM and verified by sequencing. The reproducibility, typing efficiency and discriminatory index (DI) values of our test were 100%, 85% and 0.94, respectively. In total, 14 dog urine samples (22.2%) and 13 pig urine samples (14.8%) were positive to *lipL32* qPCR. HRM showed 10 of the dog urine samples contained a genotype 2 leptospire (serovars: *L. interrogans* Australis, *L. interrogans* Autumnalis, *L. interrogans* Djasiman and *L. interrogans* Copenhageni), one sample showed serovar *L. kirschneri* Grippatyphosa. Only five pig urine samples contained genotype 2, however, four contained a *L. santarosai*, and one each *L. kirschneri* and *L. noguchii*. Two samples each from dogs and pigs did not amplify. We show that HRM has high discriminatory power for genotyping pathogenic subspecies of *Leptospira* spp. Furthermore, three

pathogenic *Leptospira* species (*L. santarosai*, *L. kirschneri* and *L. noguchii*) had not been previously identified in pigs in this area. In conclusion, HRM can be a useful tool to investigate the genetic epidemiology of leptospirosis when culture is not possible.

***Key words: Leptospira* spp., HRM, diagnosis, genotypification.**

I. INTRODUCCIÓN

La *Leptospira* es una bacteria en forma de espiroqueta perteneciente al orden Spirochaetales y a la familia Leptospiraceae. Inicialmente el género *Leptospira* constaba de dos especies, *L. interrogans*, especie patógena que infecta humanos y animales, y *L. biflexa*, especie no patógena que habita en el medio ambiente (Mohammed *et al.*, 2011). Actualmente, se conocen 21 especies de *Leptospira* patógenas, basándose en su similitud a nivel de secuencia mediante la técnica de hibridación ADN-ADN (Ko *et al.*, 2009). Sin embargo, desde una perspectiva clínica y epidemiológica, existe una clasificación basada en diferencias antigénicas con base en el test de Microaglutinación (MAT), el cual es la técnica de oro para la serotipificación de *Leptospira*. Es así que se conoce 200 serovariedades de *Leptospira*, las cuales a su vez pertenecen a 25 serogrupos en función a la similitud de sus antígenos (Tilahun *et al.*, 2013).

En el Perú se han aislado, a partir de muestras de sangre y orina, *Leptospira* correspondientes a los serogrupos: *Pomona*, *Hebdomadis*, *Canicola*, *Tarassovi*, *Icterohaemorrhagie*, *Cynopteri*, *Bataviae*, *Grippotyphosa*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Australis*, *Shermani*, *Javanica*, *Autumnalis* y *Panamá*, siendo los principales reservorios domésticos: cerdos, perros y bovinos; mientras que en los reservorios silvestres, encontramos a la rata de desagüe, la rata espinosa y los marsupiales en la selva (Céspedes *et al.*, 2006).

La leptospirosis se adquiere cuando una persona entra en contacto con animales infectados, agua, suelo o lugares contaminados por la orina de los reservorios. Esta enfermedad tiene una clara vinculación ocupacional, asociada a actividades que favorecen el contacto con los animales o sus productos. Este

es el caso de los veterinarios, criadores de animales, empleados de mataderos, trabajadores rurales de zonas de humedales (arroceras y caña de azúcar), granjeros, trabajadores de alcantarillados y hurgadores de residuos.

En el área urbana, la población más vulnerable vive en condiciones precarias, sin saneamiento, expuesta a contacto con roedores (Céspedes *et al.*, 2003). Los roedores frecuentemente son implicados como portadores y diseminadores de *Leptospira*, sin embargo, existe un amplio rango de hospederos que también pueden diseminar la enfermedad por largos periodos, este es el caso de los animales domésticos y de crianza, como perros, gatos, cerdos y ovinos (Petrakovsky *et al.*, 2013). Por esta razón la leptospirosis puede ser controlada mediante la reducción de su prevalencia en animales salvajes y domésticos. En el caso de los últimos, el control puede generarse a través de la vacunación, sin embargo, es necesario conocer las serovariedades de *Leptospira* circundantes, ya que sabe que un reservorio en particular presenta una predisposición a infectarse con un número limitado de serovariedades de la bacteria (Bharti *et al.*, 2003). Es así, que un correcto sistema de vacunación con base en las serovariedades circundantes en reservorios probablemente es el factor más importante para evitar que la Leptospirosis se convierta en una epidemia crítica.

En lugares con escaso control de vacunación y bajos niveles de saneamiento como el distrito de Belén en la región Loreto, la prevalencia de la enfermedad aumenta sobre todo en temporadas con altos niveles de precipitación por lo que se vuelve necesaria la implementación de controles de riesgo de leptospirosis a partir del conocimiento de su epidemiología (Céspedes *et al.*, 2004).

El cultivo y el MAT (Test de Microaglutinación) se siguen utilizando ya que estos métodos son los estándares para el diagnóstico de leptospirosis, sin embargo, MAT es una técnica imperfecta ya que existe el riesgo de presentar reacciones cruzadas entre serovariedades es y difícil de interpretar, además de que necesita de subcultivos semanales de todas las serovariedades con mayor prevalencia en el país, lo que dificulta su realización.

Como una alternativa rápida en el diagnóstico de *Leptospira* sp. se están implementando nuevos métodos moleculares rápidos y sencillos, entre ellos se tiene al MLST (por sus siglas en inglés: Multilocus Sequence Typification), el cual utiliza una PCR convencional para amplificar siete genes cuyas variantes permiten asignar un genotipo a cada serovariedad de *Leptospira* (Musso y La Scola, 2013), sin embargo, requiere un posterior secuenciamiento, lo que implica una considerable pérdida de tiempo durante su realización. Además, se tienen casos en los que los perfiles alélicos obtenidos mediante esta técnica no diferencia entre dos serovariedades (Ahmed *et al.*, 2006a). Por otro lado, el PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta mucho más rápida y sensible, logrando altos niveles de especificidad, en un periodo muy corto de tiempo, sin embargo, sólo permiten el diagnóstico de *Leptospira*, mas no una tipificación a nivel de serovariedades. Una de las modificaciones más recientes es el Análisis de Melting de Alta Resolución (HRM: por sus siglas en inglés, *High Resolution Melting*) la cual es una técnica que permite detectar cambios en el perfil de *melting* entre dos secuencias que se diferencian en un nucleótido, sin la necesidad de análisis adicionales de electroforesis o secuenciamiento (Naze *et al.*, 2015), haciéndola una herramienta valiosa para la genotipificación de *Leptospira* spp.

Por esta razón, la presente tesis tiene como objetivo evaluar el potencial de un sistema HRM en cepas de referencia de *Leptospira* como una herramienta en la tipificación de la bacteria que permita más adelante la construcción de la epidemiología de la leptospirosis, la evaluación y seguimiento del riesgo de animales domésticos o en constante contacto con el ser humano, como reservorios de *Leptospira*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La prueba del MAT es el método de referencia para identificación de serovariedades de *Leptospira*, pero su desventaja es que necesita una gran variedad de antígenos vivos, y depende de la realización de cultivos continuos cuyo crecimiento es lento a comparación de otros microorganismos, aumentando el tiempo de diagnóstico. Por otro lado, la asignación del serogrupo por MAT es compleja debido al alto grado de reacciones cruzadas y su sensibilidad es relativamente baja comparada a otras pruebas de diagnóstico utilizadas comúnmente. Adicionalmente, no se puede lograr un diagnóstico temprano utilizando MAT ya que los anticuerpos no aparecen en la sangre hasta el día 7 u 8 de la fase aguda, a pesar de que se conoce la existencia de una relación entre los altos niveles de mortalidad ocurridos antes del quinto día de infección con un tratamiento tardío de la enfermedad (Sharp *et al.*, 2016). Existen estrategias de diagnóstico que buscan la detección de la bacteria por métodos directos y moleculares, este es el caso del ensayo de PCR en tiempo real que amplifica el gen que codifica a la lipoproteína de membrana *lipL32* (esta lipoproteína está asociada a la antigenicidad de la bacteria y está asociada a especies patógenas de *Leptospira*), pero lamentablemente este PCR no es capaz de diferenciar entre serovariedades. Por otro lado, la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y el análisis de repeticiones en tándem (MLVA), son otras técnicas moleculares que han cobrado relevancia en la diferenciación de serovariedades de *Leptospira*, sin embargo, ambas técnicas presentan algunas incongruencias entre el tipo de secuencia o perfil alélico asignado por la técnica y la serovariedad, observándose que algunas cepas que presentan el mismo serotipo son identificadas como

diferentes especies, además, requieren de un posterior análisis de secuenciamiento, lo que consume tiempo y aumenta el costo-beneficio de la técnica, y en el caso del MLST, aun no existe una un esquema para la identificación de serovariedades de la especie *L. santarosai*.

III. MARCO TEÓRICO

III.1. Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por especies patógenas de la bacteria Gram-negativa del género *Leptospira* y es principalmente transmitida por roedores, sin embargo existe un amplio rango de reservorios capaces de diseminar la enfermedad como perros, gatos, animales de granja y algunas aves (Evangelista y Coburn, 2010).

Esta enfermedad se puede manifestar con varias formas clínicas, que varían desde formas asintomáticas a una enfermedad severa. Las presentaciones clínicas más observadas son la forma anictérica, icterica o síndrome de Well, el síndrome de hemorragia pulmonar severa y algunas manifestaciones crónicas (Mohammed *et al.*, 2011).

La mayoría de los casos reportados no requieren de atención médica ya que las infecciones son subclínicas, que incluyen escalofríos, dolor de cabeza y dolor abdominal (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Por otro lado, la presentación clínica (Figura 1) de la leptospirosis anictérica inicia con una fase de leptospiremia, diseminación de la bacteria en la sangre, y termina en una fase de leptospiruria, excreción de la bacteria en la orina que también está acompañada de la producción de anticuerpos (Acha *et al.*, 2003). La leptospirosis icterica presenta la forma más severa y se caracteriza porque la manifestación clínica incluye ictericia, falla renal y hemorragia pulmonar y se conoce que un 5-10% de los casos de leptospirosis corresponden a esta forma con un alta tasa de mortalidad que oscila entre el 5-15% (Galloway y Levett, 2010).

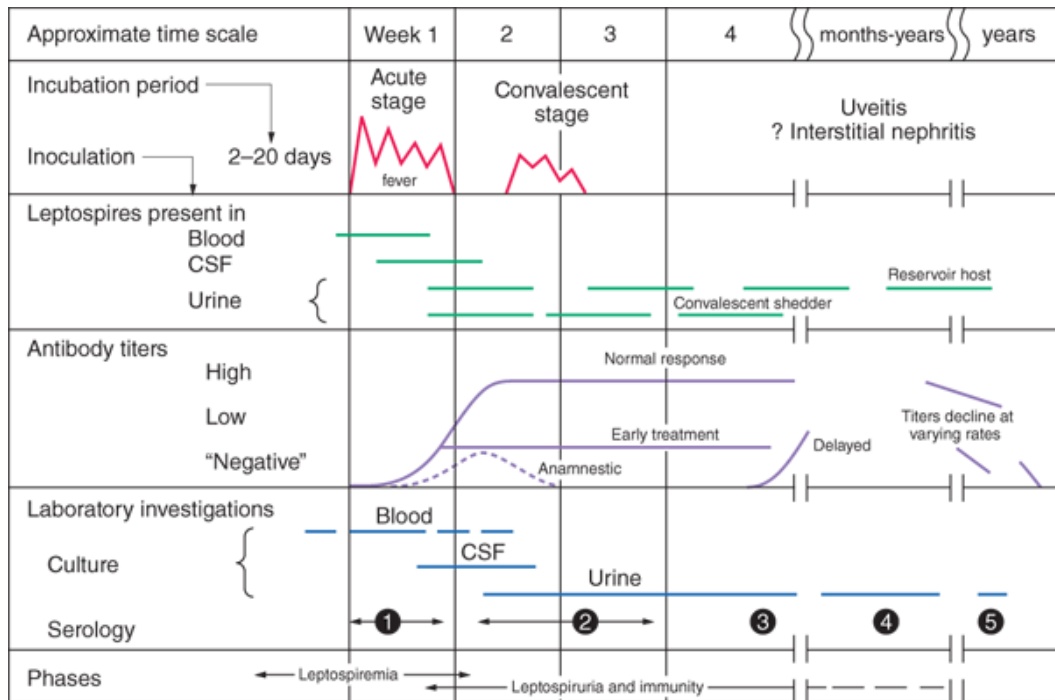


Figura 1. Presentación clínica de la leptospirosis. (Tomado de Ko *et al.*, 2009).

III.2. Leptospira

Leptospira es una espiroqueta Gram-negativa en forma de espiral (Figura 2), con un diámetro de aproximadamente 0.1 μM y una longitud entre 6-20 μM , posee ambos extremos doblados en forma de ganchos similar a un signo de interrogación, dando origen al nombre de la primera especie descrita (*Leptospira interrogans*), y a la vez esta característica permite diferenciarla de otras espiroquetas (Picardeau, 2017). Tiene dos flagelos axiales que le confieren un movimiento tanto rotacional como circular. Pertenecen al grupo de bacterias Gram-negativas ya que poseen doble membrana, la externa es rica en lipopolisacáridos (LPS), los que le confieren su antigenicidad, sin embargo, poseen una baja actividad como endotoxinas (Bulach *et al.*, 2000).

En relación a su comportamiento, son aerobias obligadas, productoras de catalasas y oxidasas, su crecimiento es muy lento, además son muy móviles y su temperatura de crecimiento oscila entre 28-30 °C (Levett, 2001).

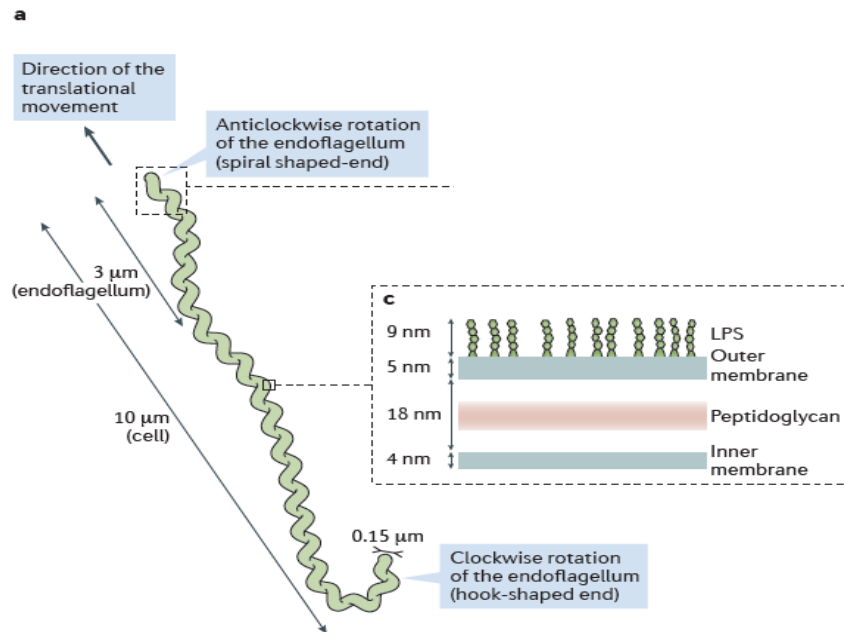


Figura 2. Características morfológicas de *Leptospira*. (Tomado de Picardeau, 2017).

III.3. Clasificación taxonómica de *Leptospira*

III.3.1. Clasificación serológica.

El género *Leptospira* fue propuesto por Hideyo Noguchi en Japón (Noguchi, 1918), luego del estudio de varios aislados, con el fin de diferenciar a la espiroqueta responsable de la enfermedad de Weil de otras ya conocidas como *Treponema pallidum* y *Spironema*. Esta diferencia se basó en estudios de morfología mediante pruebas de aglutinación, es así que en 1948 se reconocieron 4 especies de *Leptospira*: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hebdomadis*, *L. biflexa*, y *L.*

Canicola. Sin embargo, el número de estas especies fue aumentando proliferativamente al no contar con un método de diferenciación adecuado, considerándose que la asignación de especies basada en algunas diferencias serológicas no tenía justificación, por lo que en 1954 se sugirió el uso del término serotipo (serovar) como unidad taxonómica básica. Se consideraba que dos cepas pertenecían a serotipos distintos si luego de una absorción cruzada, con una cantidad adecuada de antígenos heterólogos, el 10% o más del título homólogo permanecía en cada uno de los dos antisueros, lo que resultó en la aparición de distintos serotipos (Stallman, 1984). Más adelante, en 1962, el Subcomité Taxonómico de *Leptospira* recomendó que las cepas patógenas debían llamarse *L. interrogans* y las cepas saprofíticas *L. biflexa*.

III.3.2. Clasificación molecular.

Actualmente, las especies de *Leptospira* ya no corresponden a las dos especies previamente reconocidas como *L. interrogans* y *L. biflexa*, ya que, existe un sistema de clasificación molecular que tiene como unidad sistemática **a la especie**, y está basada en hibridación ADN/ADN, la cual mide el grado de relación genética y es considerada como la prueba de oro para la diferenciación dentro del género *Leptospira*. Es así, que actualmente se conocen 21 genomo-especies de *Leptospira* (Figura 3) (Picardeau, 2013), las cuales se distribuyen en especies patógenas; que causan una patología clínica y sólo se replican en el hospedero; especies saprófitas, que sólo se replican en el ambiente y no causan ninguna patología y finalmente especies intermedias que se encuentran en el ambiente pero que a pesar de contar con algunos genes de virulencia no son capaces de ocasionar un cuadro clínico en el hospedero (Fouts *et al.*, 2016). Adicionalmente, esta

agrupación tiene respaldo en el análisis filogenético del gen ribosomal 16S, y algunos genes de lipoproteínas de membrana como *lipL32* (Yang *et al.*, 2002).

III.3.3. Especie y serovariedad.

El sistema de clasificación clásico de *Leptospira* se basa en serología, además, las técnicas moleculares han aportado grandes avances en cuanto a la taxonomía de esta bacteria, sin embargo, ambas clasificaciones no presentan una relación directa ya que una especie puede presentar diferentes serovariedades (Bharti *et al.*, 2003). Se ha observado que diferentes especies tienen los mismos genes que intervienen en la síntesis de lipopolisacáridos, lo que implica la existencia de transferencia horizontal responsable del cambio a nivel genético de los determinantes antigénicos del lipopolisacárido (Haake *et al.*, 2004).

Las serovariedades se han establecido en base a la diversidad de carbohidratos que componen los lipopolisacáridos de la membrana externa de la bacteria mediante técnicas como el MAT (Blanco y Romero, 2012) y CAAT (Test de absorción de aglutinación cruzada) (Levett, 2001). A pesar de que la serovariedad no es considerada como una unidad taxonómica válida, la clasificación con base en ella se mantiene debido a que algunas serovariedades de la bacteria están asociadas a reservorios animales específicos. Actualmente se conocen 260 serovariedades patógenas, que pertenecen a 24 serogrupos y 60 serovariedades saprófitas (Brenner *et al.*, 1999).

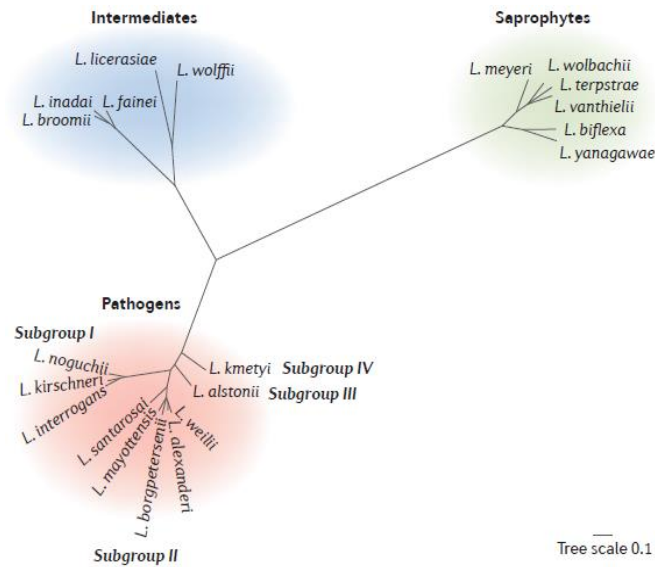


Figura 3. Filogenia de *Leptospira*. (Tomado de Picardeau, 2017).

Species	Valid publication
<i>L. alexanderi</i>	Brenner et al. (1999)
<i>L. alstonii</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. biflexa</i>	Faine and Stallman (1982)
<i>L. borgpetersenii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. broomii</i>	Levett et al. (2006)
<i>L. fainei</i>	Pérolat et al. (1998)
<i>L. idonii</i>	Saito et al. (2013)
<i>L. inadai</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. interrogans</i>	Faine and Stallman (1982)
<i>L. kirschneri</i>	Ramadas et al. (1992)
<i>L. kmetyi</i>	Slack et al. (2009b)
<i>L. licerasiae</i>	Matthias et al. (2008)
<i>L. meyeri</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. noguchii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. santarosai</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. terpstrae</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. vanthielii</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. weilii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. wolbachii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. wolffii</i>	Slack et al. (2008)
<i>L. yanagawae</i>	Smythe et al. (2013)
<i>Turneriella parva</i>	Levett et al. (2005)
<i>Leptonema illini</i>	Hovind-Hougen (1979)

Figura 4. Clasificación taxonómica de *Leptospira* basada en la técnica de hibridación ADN/ADN (Tomado de Picardeau, 2013).

III.4. Características genómicas de las especies de *Leptospira*.

Actualmente el género *Leptospira* cuenta con el genoma secuenciado de 20 especies de referencia (Figura 4). Las especies patógenas *L. interrogans* han retenido más genes de su ancestro común de vida libre, la mayoría de los cuales están relacionados con la supervivencia en el medio ambiente externo. Adicionalmente, esta especie tiene una considerable plasticidad genómica, es decir, su genoma está sujeto a inserciones de secuencias que median los re-arreglos genómicos (Xu *et al.*, 2016).

Así, el genoma de *L. borgpetersenii* (otra especie patógena) mostró una reducción de 700 kb comparada a *L. interrogans* y reveló una diferencia sustancial en el contenido genético y su organización, lo que sugiere que la bacteria está en un proceso de reducción genómica y puede estar adaptándose a un ciclo estricto de transmisión hospedero-hospedero, lo cual está respaldado por la pobre capacidad de la especie para sobrevivir en el medio ambiente (Bulach *et al.*, 2006).

Diversos estudios han hecho comparaciones a nivel genómico mediante herramientas informáticas con el objetivo de identificar mecanismos de patogenicidad que puedan explicar la diversidad de manifestaciones clínicas de la enfermedad e identificar antígenos comunes entre especies para mejorar la implementación de técnicas diagnósticas y vacunas (Ahmed *et al.*, 2006; Bulach *et al.*, 2000; Fouts *et al.*, 2016). Es así que se han encontrado diversos genes propios del grupo de *Leptospira* patógena entre los cuales tenemos a los que se encuentran en el loci del antígeno *rfb/O* también conocido como Antígeno-O loci. Este loci se caracteriza por contener genes que codifican una serie de

lipoproteínas y a la vez proteínas encargadas de su síntesis y modificación postraducciona. Varias proteínas encargadas del procesamiento de polisacáridos en este loci son sintetizadas por mecanismos dependientes de la polimerasa Wzy, codificada por el gen *wzy*, que a su vez sólo se encuentra en especies patógenas, sin presentar ortólogos en especies intermediarias (Fouts *et al.*, 2016).

En el loci del Antígeno-O podemos encontrar 13 enzimas, involucradas en la biosíntesis del Lípido A, el cual es una endotoxina de *Leptospira* patógena. La toxicidad es conferida gracias a una fosforilación en una posición diferente en comparación con otras especies que presentan esta endotoxina, como *Neisseria* spp. (Nahori *et al.*, 2005). De las 13 enzimas involucradas en su síntesis, *lpxC* se encuentra únicamente en especies patógenas de la bacteria.

Adicionalmente, también se encontraron proteínas involucradas en la síntesis de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), como *neuB*, el cual ha sido asociado a mecanismos de evasión a neutrófilos que generalmente está asociada a la superficie de células de mamíferos, pero que también está presente en bacterias como *Leptospira*. (Fouts *et al.*, 2016).

La identificación y caracterización de componentes de la membrana externa de las especies de *Leptospira* es compleja (Hernández *et al.* 2014), sin embargo varias proteínas y lipoproteínas han sido determinadas, ya que por su estratégica localización son responsables de la interacción entre la bacteria y su hospedero, además estas proteínas participan muchas veces en mecanismos de evasión contra la respuesta inmune. Así, entre los genes que codifican proteínas de membrana externa y que han sido reportados como candidatos para el diagnóstico de

Leptospira patógenas se encuentran *lipL32* y *ompL1*, que codifican una lipoproteína y una proteína de membrana externa, respectivamente. Ambas proteínas de membrana se han visto involucradas en la respuesta del hospedero por la activación de receptores tipo Toll y en la invasión de la bacteria favorecida por la adherencia de estos a la fibronectina, ya que esta última funciona como una envoltura que permite el enmascaramiento de la bacteria hasta llegar a diversos tejidos del hospedero (Hauk *et al.*, 2008).

III.5. Características del ciclo de vida y el hospedero

Existe un amplio rango de hospederos tanto silvestres como domésticos capaces de infectarse fácilmente con la bacteria, lo cual resulta en una amplia distribución mundial de la enfermedad, adicionalmente su diseminación es facilitada por la capacidad de la bacteria de sobrevivir en fuentes hídricas y suelos húmedos (Ullmann y Langoni, 2011).

Los principales reservorios de la enfermedad son los roedores, aquí no sólo están incluidos las ratas y ratones sino también topes, musarañas, erizos y marsupiales. En roedores la infección es asintomática y se convierten en diseminadores y transportadores crónicos de la bacteria en el ambiente, además pueden excretar a la bacteria por la orina de forma intermitente o continuamente a lo largo de toda su vida, por lo que son importantes en la conexión de los ciclos rurales y urbanos de la enfermedad en zonas tropicales («Human leptospirosis», 2003).

Los hospederos adaptados de la enfermedad como los perros, gatos, cerdos, caballos, vacunos, ovejas, etc. presentan un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde formas agudas, como fiebre y hemorragia pulmonar, hasta

formas como la uveítis. Al presentar sintomatología estos hospederos pueden padecer de problemas reproductivos y provocar grandes pérdidas económicas, sin embargo algunas serovariedades no causan un daño grave en hospederos que están altamente adaptados (Samir *et al.*, 2015).

Luego de la excreción de la bacteria por la orina de los hospederos esta puede sobrevivir por semanas o meses siempre y cuando se encuentren en un ambiente húmedo provisto de fuentes hídricas, ello mediante la formación de biopelículas y agregación celular, característica que también le sirve para mantenerse en el tejido de sus hospederos (Ullmann y Langoni, 2011).

El humano es considerado un hospedero accidental de la bacteria y su infección ocurre por contacto directo con la orina contaminada de los reservorios o indirecto por contacto con fuentes contaminadas con orina infectada (McBride *et al.*, 2005). La bacteria ingresa a través de heridas o mucosas expuestas y se dirige al torrente sanguíneo para luego diseminarse en diferentes tejidos (Figura 5). A medida que aumenta la producción de anticuerpos en respuesta a la bacteria, la carga bacteriana en órganos y tejidos desaparece, sin embargo, *Leptospira* puede alojarse en sitios inmunoprivilegiados como los riñones y el humor vítreo de los ojos (Cruz *et al.*, 2009). Los humanos no son buenos reservorios de leptospirosis debido a la naturaleza ácida de su orina y el bajo número de bacterias que son capaces de excretar (Lehmann *et al.*, 2014).

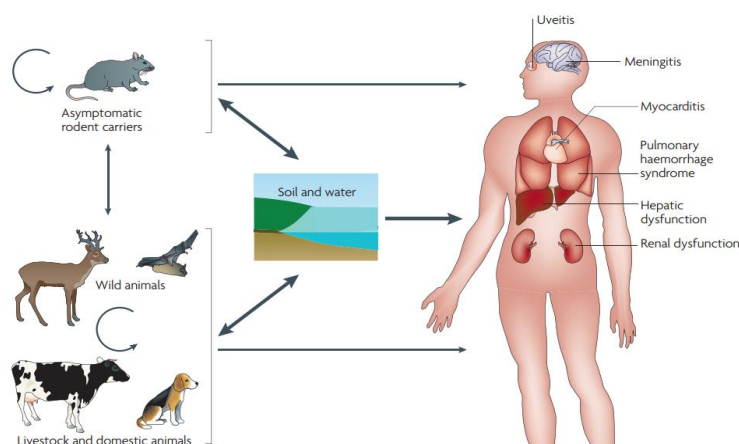


Figura 5. Ciclo de vida de *Leptospira*. (Tomado de Ko *et al.*, 2009).

III.6. Relación serovar-hospedero

La relación serovar / reservorio de se caracteriza por la gran receptividad de la animal al serovar en cuestión y la transmisión eficiente de la enfermedad entre animales de la misma especie, con una prevalencia relativamente alta de la infección (30 a 50%), producción de enfermedad crónica y una baja producción de anticuerpos contra el serovar infectante (Alonso *et al*, 2001; Fowler, 2003).

En contraste, la infección serovar /hospedero accidental se caracteriza por una prevalencia relativamente baja, alta patogenicidad para el animal, producción de enfermedad aguda y una marcada respuesta de anticuerpos. (Fowler, 2003).

En el caso de una infección crónica se observa un equilibrio entre el hospedero y ciertas serovariedades; este es el caso de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo y *L. interrogans* serovar Hardjo en ganado, *L. interrogans* serovar Canicola en perros, *L. interrogans* serovar Pomona en cerdos, y *L. interrogans* serovar Copenhageni en ratas (Bharti *et al.*, 2003). En estos casos el hospedero es comúnmente asintomático y la bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune para colonizar

los túbulos renales y finalmente ser expulsada por la orina. *Leptospira* coloniza los túbulos renales de su hospedero a pesar de la activación de varios procesos de respuesta inmunológica como la infiltración de linfocitos en el intersticio, la producción de anticuerpos contra la bacteria, la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMH II) y la activación de los receptores de tipo Toll (TLR).

Las diferencias en la susceptibilidad entre diferentes animales reservorios a un serovar en particular han sido evaluadas desde la genética del mismo hospedero. Un ejemplo de esto, es la activación diferencial del TLR en humanos y murinos, provocada por los diferentes lipopolisacáridos (LPS) o lipoproteínas de *Leptospira* presentes en su membrana externa. La lipoproteína lipL32 activa a TLR 2, generando una respuesta inflamatoria a nivel de los nefrones, mientras que la lipoproteína lipL41 no induce a la nefritis (Yang *et al.*, 2002). Adicionalmente el TLR 4 agonista al lípido A, componente tóxico activo de los LPS de *Leptospira*, está presente en humanos más no en murinos, lo que sugiere que el reconocimiento diferencial de este lípido A por diferentes especies hospederas podría tener un rol importante en la susceptibilidad a una especie o serovariedad de la bacteria y en la progresión de la enfermedad (Nahori *et al.*, 2005).

Por otro lado, se han observado diferencias en la predisposición genética de individuos a presentar una infección crónica como resultado de las variantes alélicas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMH II). Estudios en cerdos, mostraron una marcada variabilidad en la expresión de CMH II y distribución durante la nefritis crónica provocada por *Leptospira*. Interesantemente, el CMH II no presenta antígenos de la bacteria en los túbulos

que se encuentran colonizados por ella. Sin embargo, en los túbulos adyacentes donde la bacteria no coloniza, se observa una expresión variable de CMH II, lo que sugiere un potencial mecanismo de defensa por parte del hospedero para evitar la posterior colonización de la bacteria en otros túbulos renales gracias a la activación de los linfocitos T y la producción de citoquinas proinflamatorias (Radaelli *et al.*, 2009).

La evasión al sistema de complemento también es muy importante durante la colonización de la bacteria en los riñones, ya que *Leptospira* cuenta con proteínas de membrana capaces de unirse a proteínas del complemento como C4BP, reclutándolas e impidiendo que se desencadene la opsonización (Lambris *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se planteó la hipótesis de variación en la expresión de proteínas antigénicas debido a una regulación negativa durante la infección crónica lo que facilitaría la colonización de la bacteria en las túbulos renales y la persistencia de la leptospiruria en la presencia de una respuesta inmune específica (Faine, 1962). Esta idea fue apoyada por un estudio en murinos donde se demostró que los anticuerpos provenientes del suero de ratas infectadas crónicamente reaccionaban con más antígenos de *Leptospira* cultivada *in vitro* que con *Leptospira* proveniente de la orina de las ratas infectadas (Mulla *et al.*, 2006).

Finalmente, la relación entre el hospedero y *Leptospira* es muy compleja y aún se está investigando, sin embargo, la evasión a la respuesta inmune en reservorios está ligada estrechamente a componentes de la membrana de la bacteria, lo que apoya la existencia de serovariedades específicamente relacionadas a un

determinado reservorio. En consecuencia, este hecho facilitaría la implementación de vacunas.

III.7. Leptospirosis en Perú

En el Perú la Leptospirosis ha evidenciado un comportamiento endémico, con brotes que correspondían a un determinado tiempo o lugar, causando una transmisión indirecta de las personas en contacto con agua contaminada por *Leptospira*, principalmente en regiones de Loreto, Ucayali, Madre de Dios, Cusco, Ayacucho y Lima (Alarcón-Villaverde *et al.*, 2014).

Un estudio en la región Loreto reportó que la presencia de la especie *L. interrogans* estaba asociada a la zona urbana de Belén, principalmente en alcantarillas abiertas y en agua estancada de río en comparación con las fuentes subterráneas de agua. Este hallazgo fue explicado por la presencia de roedores, perros y cerdos crónicamente infectados. Además las ratas de Belén comúnmente portan *L. interrogans*, sugiriendo la importancia de este animal en la transmisión de Leptospirosis en esa área (Johnson *et al.*, 2004). Entre los años 2012 y 2014 (Figura 6), en consecuencia a las intensas lluvias que se dieron desde Diciembre de 2011, muchos ríos incluyendo el Amazonas, Huallaga y Ucayali, sobrepasaron su caudales máximos lo que terminó erosionando cauces y riberas provocando inundaciones en las viviendas cercanas y el aislamiento de varios distritos en Iquitos, como Puchana, San Juan Bautista y Belén. A raíz de ello, hubo un incremento en el número de casos de leptospirosis, observándose que la región Loreto representó el 70.6% de los casos confirmados a nivel nacional y dentro de

esta región las provincias de Yurimaguas, Puchana, San Juan Bautista y Belén representaron el 93.4% de los casos (MINSA, 2015).

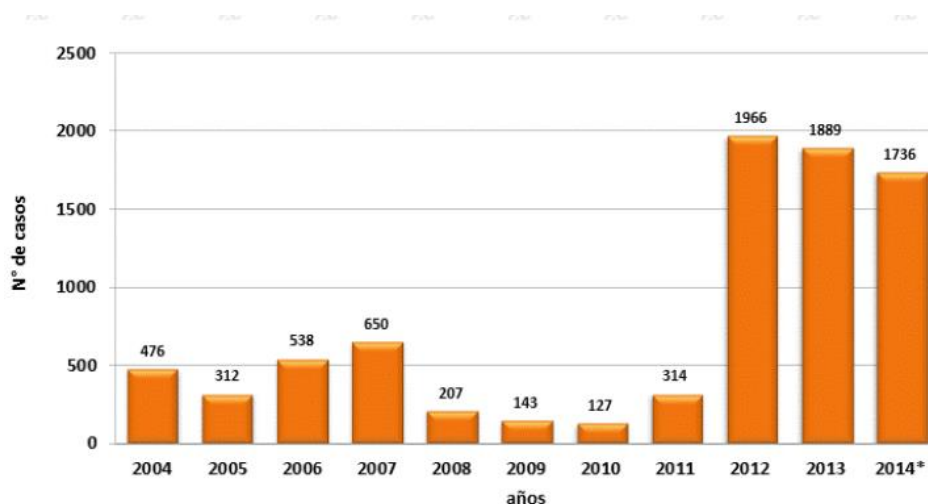


Figura 6. Casos de Leptospirosis en Perú hasta el 2014. (Tomado de Boletín epidemiológico del MINSA, 2014).

En consecuencia la reemergencia de la enfermedad, a partir del 2014, mejoró la vigilancia epidemiológica sobre todo en las regiones más afectadas detectando los principales riesgos como el servicio de alcantarillado, limpieza pública, contacto con animales de compañía y crianza, entre otros.

En otras regiones, se reportó un brote sin antecedentes en el distrito de Tambo Grande en Piura en 2015, debido al colapso del sistema de agua y alcantarillado.

La situación de la leptospirosis tuvo una crisis en el 2017 a raíz del Niño Costero” (Figura 7), que vino acompañado de huaycos originados por lluvias torrenciales que en corto tiempo incrementaron las condiciones de riesgo de la enfermedad. Es así que los departamentos de Tumbes, La Libertad, Piura y Lambayeque representan el 16% de casos a nivel nacional, valor que ha crecido de manera exponencial en comparación con años anteriores. También hubo un incremento de

casos en Cajamarca, provincia de Jaén, mientras que en la costa central hubo un aumento de casos tanto en Lima como en Ica, en este último han aparecido nuevas zonas de transmisión (MINSA, 2017)

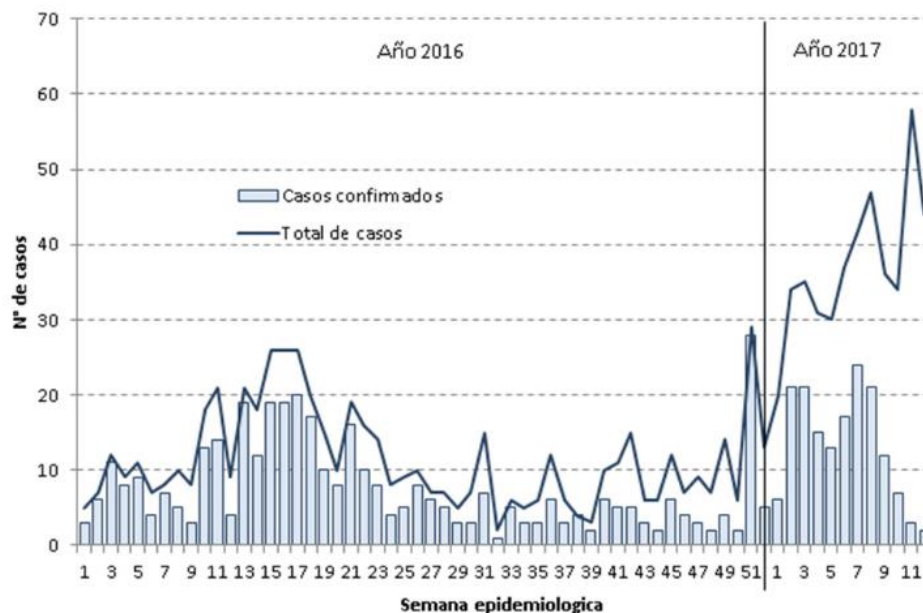


Figura 7. Tendencia de los casos notificados entre el 2016-2017 por inundaciones y huaycos. (Tomado de Boletín epidemiológico MINSA, 2017)

III.8. Diagnóstico y tipificación de *Leptospira*

III.8.1. Prueba de oro: Prueba de Microaglutinación (MAT).

El diagnóstico convencional de la leptospirosis se realiza mediante el cultivo de muestras clínicas, la visualización directa de la bacteria por microscopía de campo oscuro a partir de orina o sangre y la demostración de la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en sangre periférica mediante pruebas serológicas.

Una de las técnicas serológicas utilizadas como prueba de oro es el MAT. En este, el suero de los pacientes con leptospirosis reacciona con una suspensión de antígenos vivos de diversas serovariedades de *Leptospira*. Después de un periodo de incubación, la mezcla de suero es examinada por microscopía de campo oscuro para determinar si hay una reacción de aglutinación y determinar cuál es el título más alto al cual el 50% de las bacterias permanecen libres o aglutinadas. Esta reacción puede darnos un indicio del posible grupo al cual pertenece la bacteria infectante. Adicionalmente, es necesaria la utilización de muestras pareadas para determinar si existe un aumento en los títulos de anticuerpos contra *Leptospira*, que permita realizar el diagnóstico de una enfermedad activa (4 veces el título o un aumento mayor).

La principal desventaja radica en la necesidad en la utilización de una gran variedad de antígenos vivos para su realización, lo cual implica hacer subcultivos semanales, representando un riesgo de infección y altos costos (Musso & La Scola, 2013). Se ha tratado de utilizar antígenos formalizados pero no se ha logrado obtener titulaciones altas durante el diagnóstico. Otra desventaja, incluye el riesgo de contaminación cruzada de las cepas de referencia utilizadas, siendo necesario verificar periódicamente la pureza de cada serovariedad. El resultado de la prueba se determina por la dilución más alta de suero en la cual el 50% de las bacterias se encuentran aglutinadas con respecto al control negativo, reportándose una alta variedad en la lectura de las pruebas aún si estas son realizadas por trabajadores de un mismo laboratorio (Palmer *et al.*, 1987). Además la determinación del título de aglutinación, la asignación del serogrupo en algunas situaciones se torna compleja, debido al alto grado de reacciones cruzadas que

ocurren entre distintos serogrupos especialmente durante una fase aguda (Rak, 1983).

III.8.2. Pruebas de tamizaje y diagnóstico.

Debido a la baja sensibilidad de MAT para detectar anticuerpos tipo IgM en la etapa aguda de la enfermedad, se desarrollaron pruebas rápidas de tamizaje para la detección de anticuerpos tipo IgM. Los anticuerpos IgM son detectables durante la primera semana de la enfermedad y se ha reportado que la prueba de ELISA para la detección de estos anticuerpos en la primera etapa de la enfermedad es más sensible que la prueba del MAT (Mulla *et al.*, 2006), sin embargo, un resultado positivo mediante ELISA, no determina el serogrupo o serovar infectante y no es suficiente para diagnosticar un caso de leptospirosis ya que debe ser confirmado por MAT, PCR o cultivo.

Otras pruebas de tamizaje han sido desarrolladas utilizando como herramienta un PCR convencional o cuantitativo, para ello, se han identificado un serie de cebadores para diversos genes de mantenimiento, esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares básicas, o genes implicados en la antigenicidad de la bacteria, entre los cuales tenemos *rrs*, *rrl*, *flab*, *gyrB*, *ompL1*, *lig*, *lipL32*, *lipL41* y *secY*, pero únicamente pocos han sido validados y sujetos a evaluación clínica (Stoddard *et al.*, 2009).

En la mayoría de laboratorios especializados o centros de referencia para la leptospirosis, se han incluido las pruebas moleculares en el diagnóstico de la bacteria como una alternativa a los métodos serológicos (Taylor *et al.*, 1991) (Zuerner *et al.*, 1993). Éstos incluyen las técnicas de amplificación isotérmica,

amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos NSBA y amplificación isotérmica mediada por lazos LAM (Rahman *et al.*, 2017). Sin embargo, en la práctica los métodos de amplificación isotérmica han demostrado ser inferiores a los métodos de PCR convencional.

III.9. Tipificación de serovariedades de *Leptospira* mediante métodos moleculares.

Debido a que los métodos de referencia para la identificación de nuevos aislados de *Leptospira* a nivel de especie y serovariedad se encuentran limitados a unos pocos laboratorios de referencia a nivel mundial. Las técnicas moleculares han cobrado importancia como herramientas alternas a la identificación de nuevas serovariedades de *Leptospira*. Actualmente los métodos más utilizados son la ribotipificación, secuenciamiento y análisis filogenéticos de los genes codificantes para los ARN ribosomales (Hookey, 1990). Sin embargo, las herramientas más utilizadas son la electroforesis de campo pulsado, análisis de repeticiones en tándem de un número variable de múltiples locus (MLVA) (Majed *et al.*, 2005) y la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) (Ahmed *et al.*, 2006b).

III.9.1. Tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST)

El MLST es una técnica de tipificación capaz de diferenciar y caracterizar serovariedades de *Leptospira* usando secuencias internas de 7 genes constitutivos de aproximadamente 450 a 500 pb. Estas secuencias son amplificadas y secuenciadas en ambas cadenas de ADN y cada secuencia diferente dentro de una especie bacteriana es considerada como un alelo distinto. Finalmente para cada

serovariedad, los alelos de cada uno de los siete loci definen un perfil alélico o tipo de secuencia.

Para el género *Leptospira* se cuenta con una base de datos en línea accesible a cualquier investigador («Leptospira MLST Home Page», s. f.). Esta base de datos fue diseñada para identificar serovariedades pertenecientes a las principales especies patógenas de *Leptospira* y cuenta con tres esquemas MLST (Caimi *et al.*, 2017) y cada uno cuenta con 216, 102 y 137 perfiles alélicos diferentes para cada esquema respectivamente. Sin embargo, la mayor desventaja es que para la especie *L. santarosai* únicamente están disponibles 21 perfiles alélicos (11 del primer esquema, 6 del segundo y 11 del tercero), por esta razón para poder discriminar las 21 serovariedades es necesario utilizar los tres esquemas. Adicionalmente, es necesario verificar el tamaño de los amplicones mediante electroforesis, incluir gastos de secuenciamiento para todos los genes, y contar una gran cantidad de ADN, por lo que muchas veces es necesario un aislamiento previo de la cepa proveniente de una muestra haciendo que el uso de esta técnica se vuelva complicado y costoso.

III.9.2. Tipificación mediante el análisis de *melting* de alta resolución (HRM)

Una de las modificaciones más recientes al PCR en tiempo real es el análisis de *melting* de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés: *High Resolution Melting*), la cual es una técnica que tiene la capacidad de realizar el diagnóstico y caracterizar amplicones de PCR en un sistema cerrado, sin necesidad de posteriores análisis de electroforesis (Gundry *et al.*, 2003).

Esta técnica consiste en el análisis de mutaciones o polimorfismos genéticos e inicia con la amplificación de la región de interés, utilizando una técnica estándar de PCR en tiempo real en la presencia de un fluoróforo de naturaleza saturante, es decir, capaz de intercalarse totalmente a lo largo de toda la doble hebra. De este modo, cuando el fluoróforo se une a las cadenas de ADN de doble hebra, la fluorescencia será alta mientras que el fluoróforo libre emitirá una fluorescencia muy pobre (Wittwer *et al.*, 2003). Luego sigue el análisis de *melting*, donde la secuencia amplificada es gradualmente denaturada por pequeños incrementos de la temperatura, ello para producir un perfil de *melting* característico de la secuencia. El marcador amplificado se denatura gradualmente liberando el fluoróforo, lo cual resulta en una señal de fluorescencia que será medida por el equipo.

III.9.2.1. Principio del melting de alta resolución

Durante décadas se ha llevado a cabo el análisis de melting de amplificadores posterior a un PCR con el fin de detectar dímeros de primers u otros productos inespecíficos en la amplificación, llamándole a este procedimiento Análisis de Melting de Baja Resolución (LRM) (LRM por sus siglas en inglés: *Low Resolution Melting*). Este consistía en un incremento gradual de la temperatura en 0.5 °C que denatura el ADN amplificado, por lo que la fluorescencia decrece a la medida que el ADN de doble hebra es denaturado.

La tasa más alta de disminución de la fluorescencia se da cuando el DNA amplificado alcanza su temperatura de melting (TM). La TM está definida como la temperatura a la cual el 50% del ADN se encuentra en doble hebra y 50% en hebra simple. Los datos de fluorescencia recogidos por el equipo durante el

melting se pueden usar para inferir la TM por la construcción de gráficas de la derivada de la fluorescencia ($-dF/dT$) vs. La temperatura (T) (Figura 8). El perfil de melting depende del tamaño de los amplificadores, su contenido de GC y su secuencia.

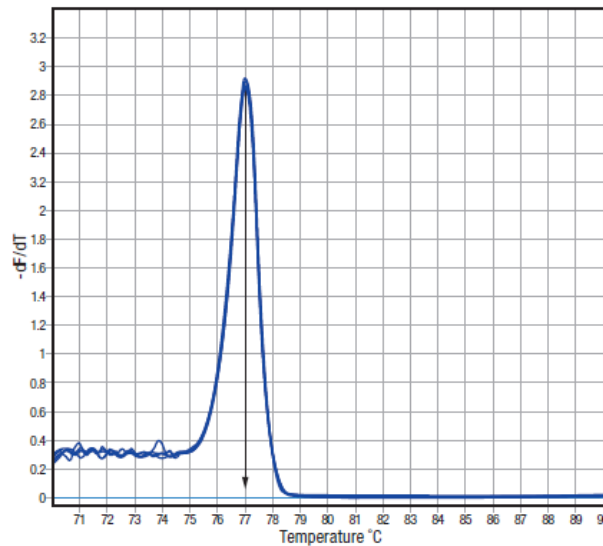


Figura 8. Curva de *melting* en un análisis de baja resolución. Pico corresponde a la TM. (Tomado de Liew *et al.*,2004).

El principio del análisis del HRM es el mismo a LRM, excepto que la diferencia de temperatura entre cada lectura de fluorescencia puede reducirse, es decir, mientras que en el *melting* de baja resolución la temperatura incrementa en 0.5 °C, en el HRM los incrementos de temperatura se reducen a valores entre los 0.008-0.20 °C, esto lleva a un incremento en la densidad de la data de fluorescencia colectada y ayuda a la generación de un perfil de *melting*, lo que permite visualizar la discriminación entre diferentes secuencias. Cada una de estas secuencias es asignada a un grupo (clúster) automáticamente por un software

especializado en el análisis de melting o manualmente, usando las diferentes opciones de presentación de datos.

III.9.2.2. Análisis de datos y obtención del perfil de melting

En un análisis de melting convencional, la data colectada sirve para construir la gráfica $-dF/dT$ vs. T mencionada anteriormente, sin embargo en el caso de HRM la data en crudo se puede utilizar para realizar diferentes análisis y obtener una mejor visualización de la diferencia entre los perfiles de las diferentes secuencias amplificadas. Para mejorar el entendimiento de cómo el software de HRM genera la discriminación, agrupamiento e identificación de los perfiles de *melting* es necesario tener en cuenta su funcionamiento. Es así que los resultados del *melting* son presentados por el software bajo tres formas:

- a. Obtención de la curva de baja calidad o en crudo,** Los datos colectados inicialmente durante el HRM tienen un rango inicial de fluorescencia denominada pre-melt, donde la señal es muy alta ya que los amplificadores se encuentran en mayor porcentaje en doble hebra. Sin embargo, esta varianza dificulta el análisis de los resultados a pesar de que se pueda apreciar una diferencia de genotipos (Figura 9). Por ello, el programa identifica áreas de fluorescencia pre y post- melt para alinear la data.

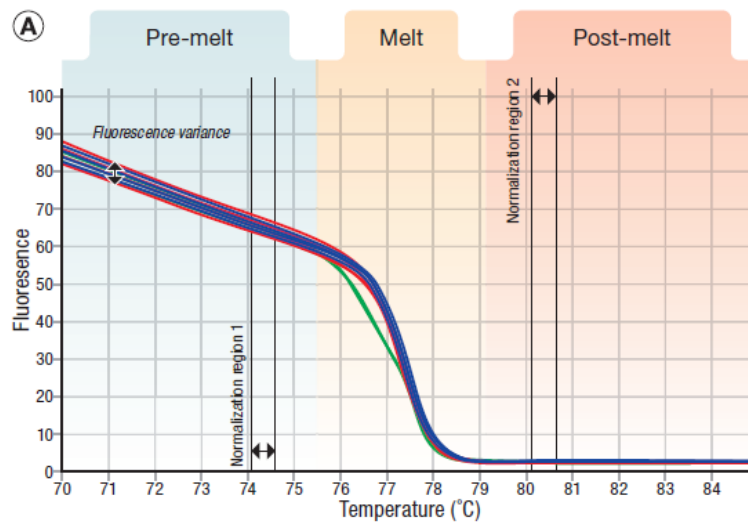


Figura 9. Curva pre y post *melting*. (Tomado de Eraly, Voelkerding y Wittwer, 2008).

- b. Obtención de la curva normalizada**, aquí la varianza de la señal de fluorescencia ha sido eliminada, y sólo se muestra el rango de temperatura entre las áreas pre y post *melting*, ello permite que los perfiles se diferencien con una mayor notoriedad (Figura 10). Para ello, la data es reescalada para que cada perfil se visualice en un rango de intensidad de fluorescencia de 0 a 1 (máxima señal); de este modo, tanto **el cambio en la temperatura de *melting*** (data proveniente del programa y visualizada en el eje-X) y la **forma de las curvas** obtenidas en la gráfica de normalización (perfil de *melting*) son usadas para identificar diferencias entre las secuencias amplificadas producto de la variación en sus perfiles de *melting*. Posteriormente el programa determina la probabilidad de la distribución de cada *cluster* basado en la desviación estándar de las curvas

de *melting* dentro del mismo *cluster*. De esta manera cada muestra es colocada en un *cluster* particular en función de la similitud de la muestra a los valores promedio de la curva de *melting* a lo largo de cada muestra en el *cluster*. A este valor de probabilidad relativa de que una muestra pertenezca a un *cluster* en particular se le denomina **nivel de confianza** y es representado por una cantidad porcentual.

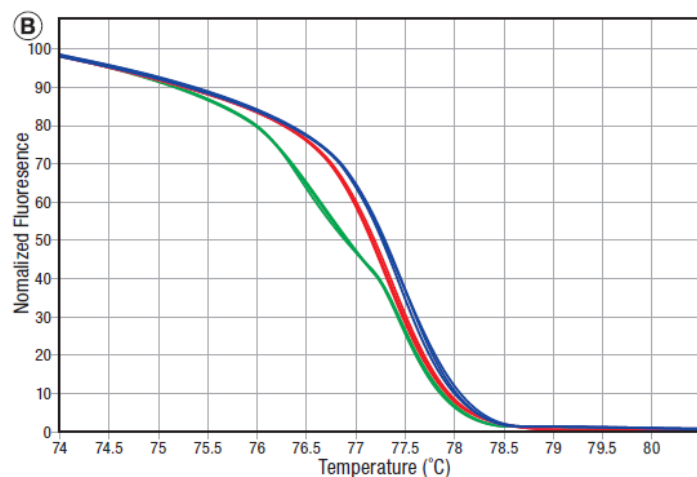


Figura 10. Curva normalizada. (Tomado de Eraly *et al.*, 2008).

- c. **Obtención de la gráfica de diferencia de curvas**, Para visualizar con una mayor facilidad la identificación de los cluster, el programa construye un gráfico de diferencia de curvas que muestra la diferencia de fluorescencia (unidades RFU) entre una muestra (uno de los pocillos en la placa de PCR) y la fluorescencia en una curva de referencia. La curva de referencia deriva del promedio de la data de fluorescencia de todas las curvas pertenecientes a un cluster de referencia el cual es elegido por el programa (por lo general el cluster con un mayor número de muestras) (Figura 11).

En consecuencia, a diferencia de los análisis de melting tradicionales donde se identifica una secuencia en particular en función al **cambio en su temperatura de melting** producto la variación en la intensidad de fluorescencia observado en el eje-X (Figura 6), en el análisis HRM, el **cambio en la intensidad de fluorescencia** visto en el eje-Y, seguido de la sustracción de la señal de referencia también puede ser usado para identificar diferencias entre secuencias.

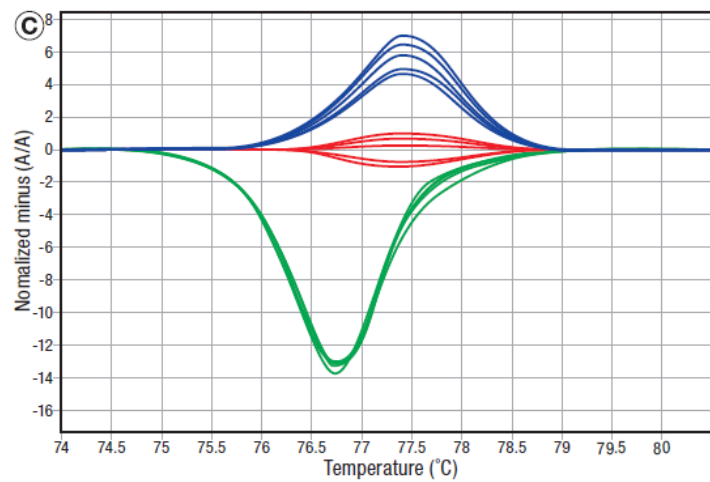


Figura 11. Curva de diferencias. En rojo: cluster de referencia. (Tomado de Eraly *et al.*, 2008).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La leptospirosis es una enfermedad con un gran potencial epidémico, que tiene una mortalidad mayor al 10% a nivel mundial (WHO, 2016) y se encuentra entre los diez primeros eventos de naturaleza infecciosa (Schneider, 2011), confirmando su importancia en la salud pública, sobre todo en ambientes tropicales que están sometidos a fuertes lluvias y precipitaciones, como es el caso de la región Loreto, en Perú. Esta enfermedad afecta a un amplio rango de animales que pueden servir como hospederos y no manifiestan signos clínicos de la enfermedad, lo que los convierte en fuentes de infección para humanos, sobre todo en el caso de animales domésticos, y otros animales que permanezcan en contacto directo con él. (Abdulla, Karstad, & Fish, 1962).

En los reservorios, las bacterias se alojan en el riñón y luego son expulsadas por la orina, a pesar de ello, la detección de la infección por *Leptospira* está basada en análisis serológico. Las interpretaciones de las pruebas serológicas pueden ser dificultosa debido a la baja respuesta de los reservorios adaptados a la infección, además, los anticuerpos pueden permanecer en sangre a pesar de que la bacteria ya no está presente en la orina. Esto hace necesario la implementación de métodos que permitan la identificación de una infección reciente.

Una técnica molecular rápida, sensible y específica como el HRM, propuesta en este estudio, podría proveer algunas claves en la identificación de serotipos de *Leptospira* spp., con la ayuda de marcadores provenientes de regiones genéticas implicadas en la reactividad serológica de la bacteria, ello, con el fin de estrechar la relación entre la serología y los métodos moleculares realizados en un solo

ensayo, evitando los problemas inherentes al aislamiento de este organismo, como la necesidad de utilizar las técnicas de PCR convencional acompañadas de secuenciamiento, las cuales son costosas y laboriosas.

Finalmente, la confirmación de una infección reciente, gracias a la identificación de la bacteria directamente de muestras clínicas como la orina, y que, adicionalmente pueda relacionarse a un serovar específico ayudaría a determinar el rol de los animales reservorios en el mantenimiento de la enfermedad e intentar construir la epidemiología de la leptospirosis en el Distrito con mayor endemicidad en la región Loreto (Belén).

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar los marcadores genéticos para la tipificación de *Leptospira* spp. patógena con mayor prevalencia en la región Loreto, utilizando un análisis de *melting* de alta resolución (HRM) en muestra directa de orina de reservorios domésticos provenientes del distrito de Belén-Iquitos

V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Seleccionar los genes marcadores para la genotipificación de serovariedades de *Leptospira* spp. patógena.
- ✓ Estandarizar el análisis HRM en 19 cepas de referencia de *Leptospira* spp. y determinar las medidas de eficiencia de la técnica: Reproducibilidad, eficiencia de tipificación e índice de diversidad.
- ✓ Caracterizar las serovariedades de *Leptospira* spp. en muestras de orina de perros y cerdos del distrito de Belén, utilizando el sistema HRM.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

La presente tesis es un estudio experimental y transversal cuyo objetivo es evaluar marcadores moleculares que permitan identificar eficientemente las serovariedades de *Leptospira* spp. patógena con mayor prevalencia en la región Loreto a partir de muestra directa de orina de reservorios (perros y cerdos) utilizando como herramienta de tipificación el Análisis de *melting* de alta resolución.

Para ello, se siguió el esquema de la Figura 12. Se inició seleccionando los genes marcadores que sólo estén presentes en *Leptospira* spp. patógena y se diseñaron cebadores que amplifiquen secuencias entre 100-150 pb. Dichos marcadores fueron utilizados en cepas de referencia de *Leptospira* utilizando la técnica HRM con el fin de determinar sus perfiles de *melting* y los parámetros de eficiencia de la técnica (eficiencia de tipificación, reproducibilidad e índice de diversidad genética). Luego, se detectaron las muestras de orina de perro y cerdos (provenientes de Belén-Iquitos) que presentaban *Leptospira* patógena utilizando un PCR en tiempo real con base en la identificación del gen *lipL32*. Finalmente, las muestras positivas por PCR se sometieron a la tipificación por HRM mediante la comparación de sus perfiles de *melting* con los obtenidos a partir de las cepas de referencia. Los resultados obtenidos se verificaron por secuenciamiento.

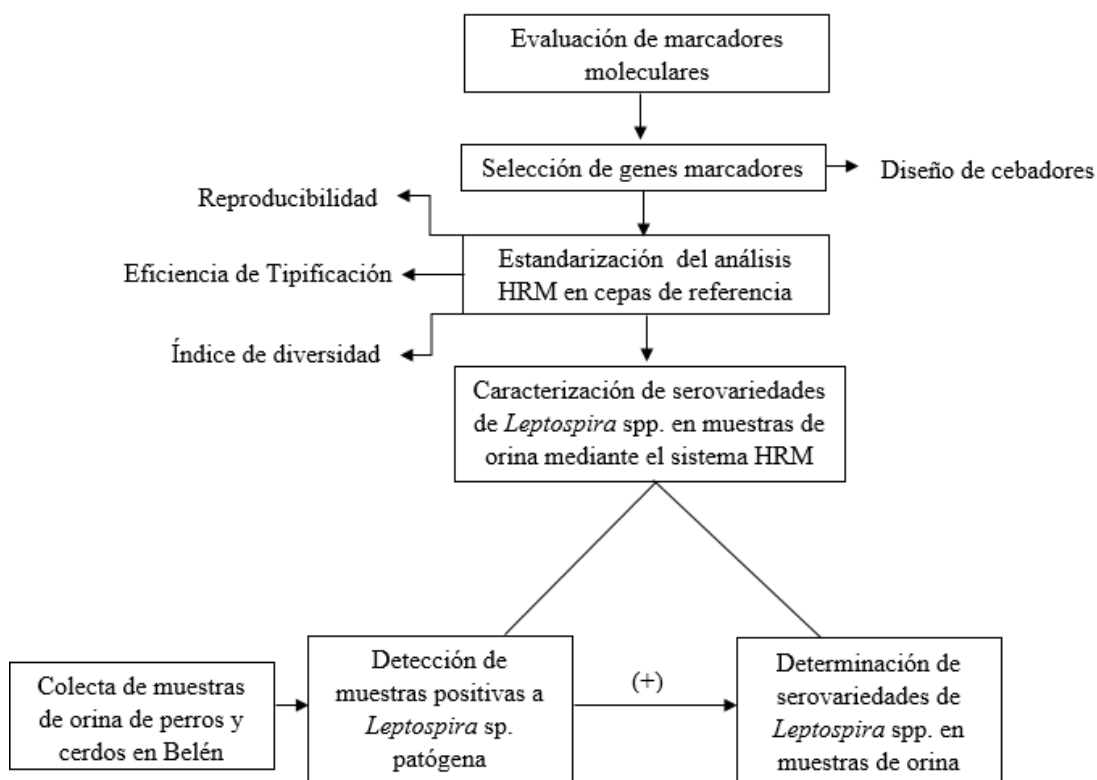


Figura 12. Diseño del estudio.

VI.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La zona de estudio y muestreo se realizó en el distrito de Belén-Iquitos en la Región Loreto. Belén es un distrito en la ciudad de Iquitos perteneciente a la Provincia de Maynas, está considerado como barrio pobre en zona urbana y está ubicado exactamente en la planicie aluvial del Río Amazonas. Belén cuenta con dos sectores importantes: los sectores 20 y 21,

En el presente estudio se colectaron muestras provenientes solo del sector 20 por ser la zona con mayor incidencia de leptospirosis humana debido a la acumulación de potenciales de riesgo como: la falta de servicios de agua y desagüe de manera continua durante el día, bajo nivel de saneamiento, elevados niveles de

precipitación y presencia de criaderos clandestinos de cerdos y aves. Este sector comprende de 102 manzanas y gran parte del sector se encuentra inundado durante la temporada de precipitación (Enero-Marzo), por lo que las casas están construidas sobre pilotes o balsas.

La estrategia de muestreo fue coleccionar al menos dos muestras aleatorias de orina por manzana con la ayuda de un veterinario y una guía que nos dirigía fácilmente hacia nuestros puntos de colecta. Para el transporte casa por casa fue necesario contratar un bote cuando el nivel del agua era muy alto. Una semana antes del muestreo, se realizó un censo de las personas que tenían canes, las cuales llenaron fichas informativas (Anexo 1) y dieron su consentimiento para la toma de muestras (Anexo 2).

VI.3. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ORINA.

Las muestras fueron colectadas con la previa aprobación ante el Comité de Ética del proyecto titulado “Rol de los animales domésticos en transmisión de Leptospirosis y bacterias resistentes a antibióticos en Iquitos” (Código SIDISI: 63691).

Colecta de muestras de orina de perro.

Debido al alto grado de dificultad en la toma de muestra de orina de perros por la deshidratación de los animales causado por el clima de la región y el transporte a través del río, no se contempló que el número de muestras sea el requerido para realizar una validación del sistema ni verificar que exista correlación entre factores de riesgo observados durante el muestreo y la presencia de la bacteria en orina.

Para la toma de muestra se colocó un bozal al animal y con la ayuda del dueño se le echó de costado sobre el suelo de modo que las patas traseras dejen la uretra expuesta, inmediatamente el área fue desinfectada con alcohol de 96° y se introdujo una sonda urinaria N° 6 en el caso de perros pequeños y medianos y N° 8 en caso de perros de raza grande. Las orinas se colectaron presionando la vejiga del animal y se colocó en frascos estériles de 200 mL. La muestra de las hembras se obtuvo por cistocentesis, que consiste en una punción directa a la vejiga utilizando jeringas estériles de 20 mL, para ello es necesario hacer una inspección en la zona superior a la uretra hasta localizar la vejiga, se desinfecta la zona y se realiza la punción.

Colecta de muestras de orina de cerdo.

Las muestras de orina de cerdos fueron obtenidas durante las madrugadas, ya que son las horas claves para sacrificar a los animales y así puedan salir al mercado. Las muestras provienen de tres mataderos clandestinos donde los animales provienen de criaderos clandestinos también del sector 20. Las vejigas fueron solicitadas inmediatamente después de que los cerdos fueran sacrificados.

La orina se obtuvo por punción directa a la vejiga del animal muerto y se colectó también en frascos estériles de 200 mL.

Se obtuvieron 63 muestras de orina de perros y 88 de cerdos, las muestras se transportaron en un *cooler* y fueron empacadas con bolsas de gel helado hasta su llegada al Laboratorio Satélite-Iquitos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde se tomaron 13 mL de orina y se depositó en tubos de 15mL. Se midió el pH de cada orina, para luego neutralizarla con Hidróxido de Sodio 0.1N

en caso tenga un pH por debajo de 7. El sedimento de la orina fue eliminado mediante centrifugación a 1000 *g*. por 5 min. El sobrenadante fue centrifugado a 40 000 *g*. por 30 minutos para coleccionar las células. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue suspendido en 200 µL de solución salina 1X. Las muestras se almacenaron a -20 °C. Para el transporte de las muestras desde Iquitos, estas se colocaron en cajas que contenían hielo seco para mantener el frío y se enviaron por avión con la finalidad de que lleguen en menos de 12 horas al Laboratorio de Microbiología Molecular en Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima (Figura 13).

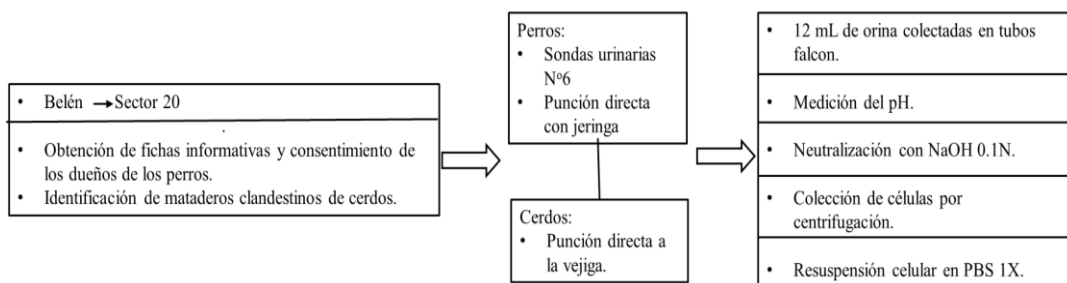


Figura 13. Esquema de colecta y procesamiento de las muestras.

VI.4. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

VI.4.1 Selección de genes marcadores: Identificación polimorfismos y diseño de cebadores.

Para llevar a cabo la identificación y diseño de cebadores de los marcadores utilizados en este estudio, se trabajó con el esquema descrito en la Figura 14.

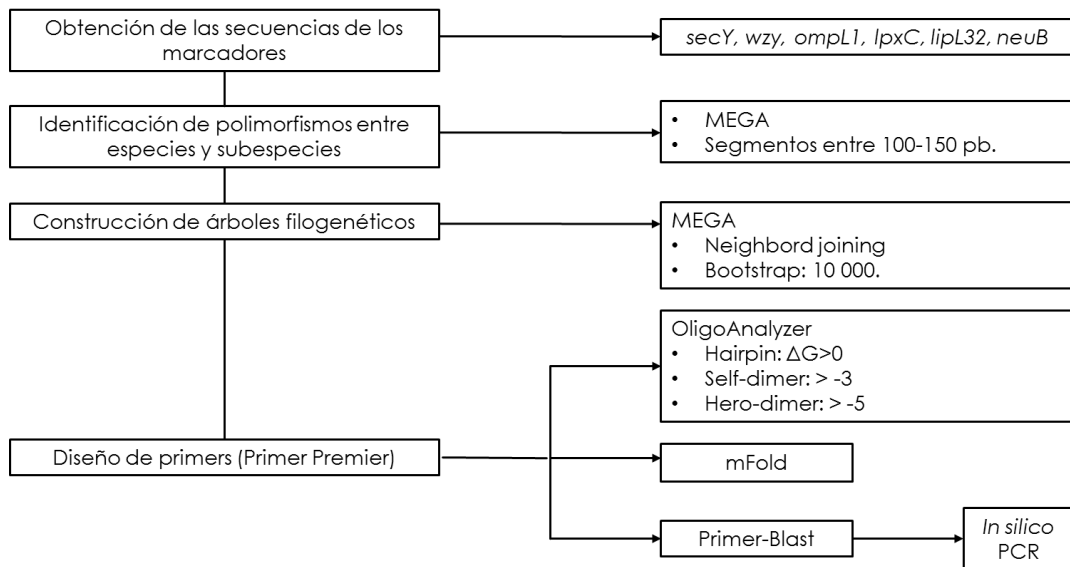


Figura 14. Esquema utilizado para la identificación de marcadores y diseño de cebadores.

En primer lugar, los genes marcadores fueron seleccionados por su participación en la respuesta inmune por ser proteínas antigénicas de membrana, toxinas o enzimas que participan en la síntesis de glicoproteínas (Tabla 1), y bajo el criterio de que su presencia esté limitada a serovariedades patógenas de *Leptospira* sp., lo cual se verificó mediante BlastN utilizando la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Es así, que las secuencias de los genes *lipL32* (lipoproteína de membrana externa), *neuB* (Ácido pseudoamínico sintetasa), *ompL1* (Proteína de membrana externa), *secY* (Proteína translocasa),

wzy (Polimerasa del antígeno O) y lpxC (N-acetilglucosamina deacetilasa) (Fouts *et al.*, 2016; Hauk *et al.*, 2008; Lambris *et al.*, 2008), fueron seleccionadas y extraídas de las serovariedades de referencia que se trabajaron en el estudio y que estaban disponibles en la base de datos del Genbank.

Tabla 1. Funciones y características de los genes marcadores para HRM.

Gen	Función	Característica	Referencia
secY	Translocasa de glicoproteínas	Pertenece a un locus altamente conservado para análisis filogenéticos.	Perez y Goarant, 2010.
Wzy	Polimerasa del cluster rfb (Antígeno-O)	Proteínas involucradas en la síntesis de polisacáridos son wzy-dependientes	Wangroongsarb <i>et al.</i> , 2007.
neuB	Ácido pseudamínico sintetasa	Síntesis de ácido siálico, evasión a neutrófilos.	Matthias <i>et al.</i> , 2016.
lpxC	N-acetilglucosamina deacetilasa	Síntesis de la endotoxina Lípido A	Matthias <i>et al.</i> , 2016.
lipL32-H	Proteína de membrana externa	Mecanismos de evasión a la respuesta inmune.	Stoddard <i>et al.</i> , 2009.
ompL1	Proteína de membrana externa	Mecanismos de evasión a la respuesta inmune.	Hernández <i>et al.</i> , 2014.

Para el análisis de polimorfismos se realizó mediante el alineamiento de las secuencias completas de todos los marcadores seleccionados utilizando el programa Mega 6 (Kumar, Tamura, & Nei, 1994). Luego, se seleccionaron fragmentos entre 100 y 150 pares de bases, dentro de cada marcador, que presentaron al menos un cambio de nucleótido entre serovariedades de una misma especie. A partir de dichos fragmentos, se construyeron árboles filogenéticos utilizando la misma herramienta Mega 6, empleando el método de Neighbord-

Joining con 10 000 réplicas de bootstrap, para seleccionar los segmentos que generen una visible separación entre las serovariedades de *Leptospira*.

VI.4.1.1. Identificación de mutaciones silenciosas y sinónimas en los genes marcadores.

Para identificar si las variaciones nucleotídicas observadas en el análisis de polimorfismos correspondieran a mutaciones no sinónimas, es decir, mutaciones que produzcan un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, se determinó el número de mutaciones silenciosas y sinónimas mediante alineamientos de secuencias de los marcadores seleccionados, utilizando el software MEGA 6.0 (Kumar, Tamura, & Nei, 1994).

VI.4.1.2. Diseño de cebadores.

Los cebadores para los genes seleccionados fueron diseñados con el fin de obtener productos de amplificación cuyo tamaño oscile entre los 100 a 150 pb, tamaño recomendado para aumentar la eficiencia del análisis de *melting*, utilizando el programa Primer Blast (Singh, Mangalam, Dwivedi, & Naik, 1998). La formación de estructuras secundarias se analizó utilizando la herramienta OligoAnalyzer (Owczarzy *et al.*, 2008), donde los cebadores que presentaron un ΔG mayor a 0 en *hairpin* (formación de estructuras secundarias dentro del primer), valores menores a -3 en el *Self-dimer* (formación de dímeros entre cebadores de un mismo sentido) y menores a -5 en *Hetero-dimer* (formación de dímeros entre cebadores de sentidos opuestos), fueron seleccionados. Para evaluar la formación de estructuras secundarias en la secuencia amplificada por los cebadores se utilizó la herramienta mFold (Owczarzy *et al.*, 2008). Los valores

determinados con estos análisis fueron comparados con los obtenidos mediante la modificación de los parámetros por defecto proporcionados por las herramientas *in silico*, de modo que se aumentó la concentración de sales (Na⁺) de 10 mM a 200 mM, con el fin de simular las condiciones en las cuales el ADN purificado de las muestras de orina tuviera alto contenido de sales y evaluar la posibilidad de que se formen estructuras secundarias que causen un resultado inespecífico durante los análisis posteriores.

Finalmente, se verificó que los cebadores sean específicos a la secuencia de interés utilizando el programa Primer Blast y en los casos en que no se evidenció dicha especificidad, se utilizó la herramienta In Silico PCR, la cual simula una reacción de PCR *in silico*, para predecir la aparición de dicha amplificación inespecífica en un futuro ensayo de PCR.

Finalmente, los cebadores diseñados se mandaron a sintetizar en Laboratorios GenLab en Seoul, Korea del Sur.

VI.4.2. Extracción y purificación del ADN.

Para la obtención de ADN, diecinueve serovares de referencia de *Leptospira* patógena, una cepa de *Leptospira* intermedia (*L. licerasiae*) y una cepa de *Leptospira* saprofítica (*L. biflexa*), provenientes del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) fueron cultivadas en medio EMJH (Miraglia, de Moraes, Melville, Dias, & Vasconcellos, 2009) por 6 días hasta que se alcanzó una densidad celular de 3×10^8 células/mL, cuantificada en una cámara Petroff Houser. El ADN fue extraído a partir de 500 µL de cultivo utilizando el Genomic Purification Kit de Thermo Scientific.

Las muestras de orina almacenadas a -20 °C fueron descongeladas a 4 °C y lavadas en 1 mL de Solución Salina 1X, luego se centrifugó a 13 000 xg. por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el ADN total se extrajo siguiendo el protocolo del Genomic Purification Kit de Thermo Scientific. El DNA fue almacenado a -20°C.

La calidad de las muestras fue verificada por electroforesis en gel de agarosa a 2.5 %.

VI.4.3 Estandarización del análisis HRM en cepas de referencia de *Leptospira* sp.

VI.4.3.1. Identificación de la temperatura óptima de hibridación de los cebadores.

Antes de llevar a cabo el análisis de HRM en cepas de referencia, se identificó la temperatura óptima de hibridación de los cebadores *lipL32-H*, *lpxC*, *secY-1*, *secY-2*, *ompL1*, *wzy* y *neuB*. Para ello, se llevó a cabo un PCR, cuya reacción tuvo un volumen total de 20 µL: 10 µL de master mix que contiene la enzima polimerasa hotstart, 3 µL de agua libre de DNasa, 1 µM (0.4 µL) de cada primer (forward y reverse) y 5 µL (10 ng) de ADN de la cepa de referencia *L. interrogans* serovar Copenhageni M20 (50 ng/µL).

Se programaron dos ensayos distintos en función a las temperaturas de *melting* de referencia que se obtuvieron con Primer Blast. Para los genes marcadores *lipL32-H*, *lpxC*, *secY-1* y *secY-2* se analizaron las siguientes temperaturas: 43.0, 43.3, 44.1, 45.0, 46.2, 47.2 y 48 °C, mientras que para los marcadores *ompL1*, *neuB* y *wzy* se analizaron: 45.0, 45.3, 46.0, 47.0, 48.2, 49.2, 49.7, 50 °C. Las condiciones

para la reacción de PCR fueron las siguientes: 95°C por 2 minutos, 45 ciclos a 95 °C por 10 minutos, gradiente de temperatura analizada por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. La temperatura donde se obtuvo una mayor señal con el Cq más bajo fue considerada como la temperatura óptima de *annealing*.

VI.4.3.2. Determinación de perfiles de *melting* en cepas de referencia.

El ensayo de PCR /HRM se llevó a cabo utilizando en ADN de las 19 cepas de referencia de *Leptospira* patógena. El ADN extraído fue cuantificado y se analizaron dos diferentes cantidades por reacción: 50ng y 10ng . Esta última concentración se analizó debido a que corresponde a un valor de Cq entre 20 y 30, que a la vez coinciden con los valores obtenidos en muestras de orina. El PCR /HRM se condujo usando los cebadores de los genes *lipl32-H*, *lpxC*, *secY-1*, *secY-2*, *ompL1*, *wzy* y *neuB*, en una reacción de 20 µL como se describió antes.

Las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes: 95°C por 2 minutos, 45 ciclos a 95 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Finalmente luego de la amplificación, el análisis de *melting* se realizó incrementando la temperatura de 65 °C a 95 °C a una velocidad de 0.2 °C/segundo.

VI.4.3.2.1. Generación de *clusters*.

Los datos de fluorescencia provenientes del análisis de *melting*, se analizaron con el *software* HRM incluido en el equipo de PCR, con el fin de obtener los perfiles de *melting* de las serovariedad de referencia. Para ello, el programa generó *clusters* que corresponden a agrupamientos las cepas de referencia en función a su perfil de *melting*. Se consideró que cada cepa de referencia pertenecía a un

cluster en particular si su nivel de confianza (generado por el *software*) era mayor al 90%. Adicionalmente, los parámetros del programa, utilizados para la generación de clusters se mantuvieron por defecto y fueron los siguientes:

- **Cambio de temperatura (*Temperature shift*):** Cambio de temperatura aplicado para cada curva de fluorescencia normalizada a lo largo del eje de la temperatura (eje-X). En el programa se puede modificar la altura de la barra de cambio de temperatura utilizando un valor entre 0 y 1 (en la gráfica normalizada). Por defecto se utilizó 0.2.
- **Sensibilidad de la curva de *melting*:** Determina el nivel de rigor, expresado en un valor porcentual, utilizado para clasificar las curvas de *melting* dentro de diferentes *clusters*. Por defecto se utilizó 50%.
- **Límite de diferencia de Tm:** Determina la menor cantidad de diferencia de Tm entre dos muestras que el software diferenciará en dos *clusters*. Se pueden escoger valores entre el 0.05 al 1, sin embargo el programa utiliza por defecto el valor de 0.15 grados.

Como control positivo, se utilizó ADN extraído de *Leptospira interrogans* ser. Copenhagenii y agua ultra pura fue incluida como el control negativo. El tamaño de los productos de PCR obtenidos fue verificado para todas las cepas de referencia utilizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Una vez se obtuvo el agrupamiento (formación de *clusters*) por cada marcador analizado, se determinaron los perfiles de *melting* de las cepas de referencia mediante la combinación de los *clusters* obtenidos para los genes *lipI32-H*, *lpxC* y

secY-1. Finalmente, cada combinación diferente fue considerada como un genotipo particular.

VI.4.3.3. Sensibilidad del Análisis de HRM

Para determinar el límite de detección de los cebadores utilizados en el análisis HRM, se realizaron diluciones seriadas 1:10 de la cepa de referencia *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20* (10^7 bacterias/ μ L a 10^0 bacterias/ μ L). Las diluciones fueron inoculadas en orina de perro y cerdo sanos. El ADN se extrajo y el análisis de PCR/HRM para los cebadores *lipL32-H*, *lpxC* y *secY-1*, se llevó a cabo tanto para las diluciones inoculadas en orina como para diluciones sin inocular, utilizando como estándar concentraciones conocidas de ADN de la cepa M20 desde 10^5 copias de genoma/ μ L hasta 10^0 copias de genoma/ μ L. El ensayo se realizó por triplicado y en tres reacciones de PCR distintas, considerándose como límite de detección la dilución más alta que amplificó por triplicado en las tres repeticiones.

VI.4.4. Caracterización de serovariedades de *Leptospira* spp. en muestras de orina de perros y cerdos mediante un sistema de HRM.

La determinación del perfil de *melting* de las serovariedades patógenas de *Leptospira* detectadas en muestras de orina se condujo mediante el sistema mostrado en la Figura 15. El sistema inicia con la detección de *Leptospira* patógena en las muestras de orina mediante la PCR en tiempo real utilizando cebadores del gen *lipL32-D* y continúa con la identificación de serovariedades mediante HRM utilizando los genes *lipL32-H*, *lpxC* y *secY*.

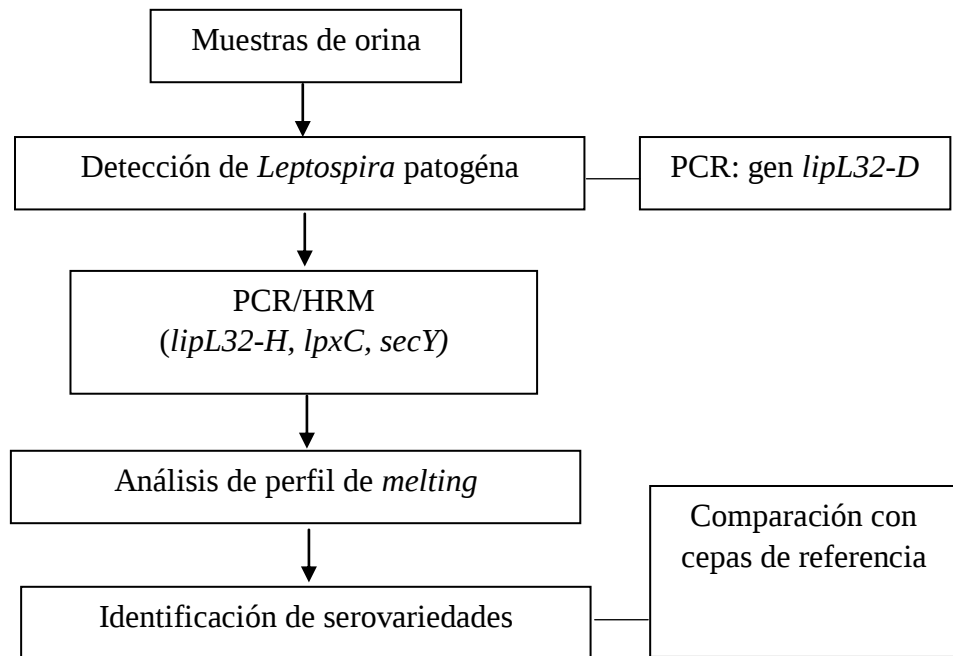


Figura 15. Esquema del sistema HRM para la genotipificación de *Leptospira* en muestras de orina.

VI.4.4.1. Identificación de muestras positivas a *Leptospira* patógenas mediante la detección del gen *lipL32*.

Antes de la identificación de serovariedades de *Leptospira* mediante HRM, se identificaron las muestras que presentan ADN de *Leptospira* patógenas. Para ello, se realizó un PCR en tiempo real que utilizó como marcador un segmento de 250 pb del gen *lipL32-D* (Stoddard *et al.*, 2009) y se determinó su sensibilidad en muestras de orina.

VI.4.4.1.1. Determinación de la sensibilidad de la detección de gen *lipL32* en orina de perro y cerdo.

Para determinar la sensibilidad de la prueba de detección se cultivó la cepa *L. interrogans* serovar Copenhageni M20 por 6 días en medio EMJH hasta que

alcanzó un crecimiento de 3×10^8 células/mL, cuantificado en una cámara Petroff-Housser. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 de modo que se partió de una concentración inicial de 1×10^8 bacterias/mL hasta 1×10^0 bacterias/mL. Las diluciones fueron inoculadas en orina de perro y cerdo sanos. El ADN fue extraído y el análisis de PCR para el primer *lipL32-D* (5'-ATCCAAGTCAACCCAATGTGG-3' y 5'-TCTGTGATCAACTATTAGGGATAC-3') se llevó a cabo utilizando como estándar concentraciones conocidas de ADN de la cepa *L. interrogans* serovar Copenhageni M20 desde 10^5 copias de genoma/ μ L hasta 10^0 copias de genoma/ μ L. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95°C por 2 minutos, 39 ciclos a 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. El ensayo se realizó por triplicado y en tres reacciones de PCR distintas, considerándose como límite de detección la dilución más alta que amplificó por triplicado en las tres repeticiones.

VI.4.4.1.2. Detección del gen *lipL32* en muestras de orina de perros y cerdos.

Para identificar las muestras que prestaban ADN de *Leptospira* patógena, 5 μ L de cada muestra fue colocada por triplicado en un mix de 4.6 μ L de agua de PCR, 0.2 μ L de cada primer y 10 μ L de enzima. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95°C por 2 minutos, 39 ciclos a 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Para obtener la concentración de ADN de *Leptospira* detectado en la muestra se realizó una curva estándar mediante diluciones seriadas del ADN de la cepa *L. interrogans* ser. Copenhagenii M20,

desde 10^5 copias de genoma/ μ L hasta 10^0 copias de genoma/ μ L. Como control positivo de la reacción se utilizó ADN extraído de *L. interrogans* ser. Copenhagenii, como control negativo se usó agua de PCR y como control de cebadores el ADN de *L. biflexa* (especie saprófita) y *L. licerasiae* (especie intermedia).

Una vez terminado el PCR, se seleccionaron las muestras que amplificaron en más de uno de los tres posillos que se cargaron por muestra. Dichas reacciones se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%, para verificar que el tamaño del producto amplificado correspondía a los 250 pb. Las muestras cuyas bandas tenían el tamaño esperado fueron consideradas positivas.

VI.4.4.2. Determinación de serovariedades de *Leptospira* spp. en muestras de orina de perros y cerdos mediante HRM.

El PCR/HRM se llevó a cabo utilizando el ADN de las muestras que resultaron positivas a *Leptospira* patógena por la detección del gen *lipL32*. Se utilizaron los cebadores de los genes *lipL32-H*, *lpxC*, y *secY-1* en tres reacciones separadas, con un volumen final de 20 μ L: 10 μ L de master mix que contiene la enzima polimerasa hotstart, 3 μ L de agua libre de DNasa, 1 μ M (0.4 μ L) de cada primer (forward y reverse) y 5 μ L (5-10 ng) de ADN de la muestra.

Las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguiente: 95°C por 2 minutos, 45 ciclos a 95 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Finalmente luego de la amplificación, el análisis de HRM se realizó incrementando la temperatura de 65 °C a 95 °C a una velocidad de 0.2 °C/segundo. Las curvas obtenidas usando HRM se analizaron con el software

HRM incluido en el equipo de PCR y los parámetros se mantuvieron por defecto. Como control positivo se utilizó ADN extraído de *Leptospira interrogans* ser. Copenhagenii cepa M20 y agua PCR fue usada como el control negativo.

La identificación de los perfiles de *melting* en las muestras analizadas y su respectivo genotipo fue hallado comparando los perfiles obtenidos en las cepas de referencia de *Leptospira* sp.

El tamaño de los amplificados se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

VI.4.5. Secuenciamiento de las muestras

Los productos de amplificación de las muestras cuyo perfil fue identificado mediante HRM, fueron purificados a partir del gel utilizando el kit Quick Gel Extraction de Invitrogen y se mandaron a secuenciar a Macrogen (Corea). Se utilizó la herramienta Mega 6 para la edición de las secuencias la construcción de árboles filogenéticos que permitieron verificar si los perfiles obtenidos con el sistema HRM correspondían con su secuencia nucleotídica.

VI.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

VI.5.1. Determinación de las medidas de eficiencia del análisis HRM en cepas de referencia y muestras

En cepas de referencia:

La reproducibilidad del sistema se evaluó mediante 10 repeticiones de PCR-HRM de dos serovariedades de *Leptospira* sp. en reacciones separadas. Si la

identificación fue la misma en las 10 repeticiones, la reproducibilidad se consideró como 100%.

La eficiencia de la tipificación, proporción de cepas que son asignadas a un tipo por el sistema de tipificación, se evaluó utilizando la fórmula: $T = N_t/N$, donde N_t es el número de cepas que fueron asignadas a un tipo and N es el número de cepas que fueron analizadas.

Para determinar el poder discriminatorio del sistema, la habilidad del sistema de genotipificación para diferenciar dos serovares no relacionados, se utilizó el Índice de Diversidad de Simpson (SI) y se consideró un alto grado de polimorfismo cuando el índice fue mayor a 90%.

En muestras:

En muestras el único parámetro determinado fue la eficiencia de tipificación.

VII. RESULTADOS.

VII.1. Colecta de muestras y población de estudio.

Durante la etapa de colecta de muestras en las casas en el sector 20 (Figura 16A), se observó que éstas no contaban con servicios de agua y desagüe, y era común ver roedores en ellas. Los habitantes del sector utilizan el agua estancada del río para bañarse e incluso lavar sus alimentos, además, los baños están contruidos de modo que las deposiciones terminen en el agua. Existen zonas en las que el nivel de agua es bajo y no permite el desplazamiento de los botes, por lo que se han contruidos caminos de madera (Figura 16B) lo cuales son muy angostos y donde los perros callejeros suelen miccionar.

Los datos del censo arrojaron que en promedio hay 2 mascotas por vivienda (entre perros y gatos). Los animales no pueden movilizarse fácilmente durante la inundación, por lo que miccionan dentro de las casas, sobre el piso que está contruido con troncos o tablas, permitiendo que la orina caiga al agua. Lo mismo ocurre en las casas que tienen criaderos de cerdos. Por otro lado, el 25% de los perros permanecen fuera de su casa durante el día y este comportamiento no cambia durante la temporada de inundación ya que es común observar perros nadando o siendo transportados en botes por sus mismos dueños. El promedio de personas que viven en las casas censadas fue de 6 personas.

Durante la toma de muestras en los mataderos clandestinos se observó que las vísceras de los cerdos es arrojada al agua y las personas que encargadas de hacerlo están descalzas paradas sobre una balsa flotante que todo el tiempo está en contacto con el agua (Figura 16B).

Se obtuvieron un total de 63 muestras de orina de perro y 88 muestras de orina de cerdo. Los datos obtenidos de los animales cuya muestra fue colectada efectivamente se muestran en la Tabla 2.

A



B



Figura 16. Muestreo del sector 20 del distrito de Belén. A) Zonas inundadas del sector 20. B) En la imagen de la izquierda: Toma de muestra de orina de perros con sondas urinarias; a la derecha: Camal clandestino, toma de muestra de orina de cerdos por punción directa a la vejiga del animal muerto.

Tabla 2. Datos obtenidos de las muestras colectadas (Marzo 2016 y Marzo 2017).

PERROS		CERDOS	
Características		Características	
Población de perro en Belén	415	Población de cerdos en Belén	ND*
Número de casas seleccionadas	63	Número de casas seleccionadas	ND
Número muestral de perros	63	Número muestral de cerdos	88
Machos	46	Machos	ND
Hembras	17	Hembras	ND
< 1 año (Cachorros)	20		
1 a 3 años (Juveniles)	23	Data de edad	ND
> 3 años (Adultos)	20		

ND*: No definido

VII.2. Selección de genes marcadores.

Las secuencias correspondientes a los 6 genes se alinearon para todas las serovariedades utilizadas en este estudio experimental y otras 31 serovariedades que pertenecen a las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirshneri* y *L. welli* que se obtuvieron de la base de datos del GenBank. El gen *lipL32* (Figura 17) mostró una mayor cantidad de cambios de

nucleótidos entre serovariedades, esta diferencia se evidenció en el árbol filogenético obtenido (Figura 18).

Por otro lado, con respecto al análisis *in silico* del PCR en diferentes concentraciones de sal, los valores de ΔG obtenidos bajo condiciones normales (50 mM Na⁺) y elevadas (300 mM Na⁺) de sales se observan en la Tabla 3. No se verificaron mayores diferencias entre los valores de ΔG en ambas condiciones, sin embargo, en el caso del marcador *lipL32-H* se obtuvo un valor menor al contemplado en la formación de estructuras secuendarias del producto de amplificación (-5.75 kcal/mol).

Las características de los 7 pares de cebadores diseñados en función a los genes seleccionados se observan en la Tabla 4.

Tabla 3. Análisis de formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores en función a los valores de ΔG .

Marcador	[Sales] (mM)	Dirección del cebador	<i>Harpin</i> (ΔG)	<i>Selfdimer</i> (ΔG)	<i>Heterodimer</i> (ΔG)	mFlod (ΔG)
<i>lipL32-H</i>	50	F	0.77	-3.57	-3.19	-3.4
		R	0.96	-3.61		
	300	F	0.66	-3.57	-3.43	-5.75
		R	0.85	-3.57		
<i>secY</i>	50	F	-1.13	-1.95	-5.02	-0.48
		R	0.41	-3.61		
	300	F	-1.46	-3.17	-5.02	-1.66
		R	0.43	-3.61		
<i>lpxC</i>	50	F	1.01	-3.61	-4.38	-2.34
		R	-0.09	-3.14		
	300	F	0.84	-3.61	-4.38	-3.45
		R	-0.01	-3.14		

Tabla 4. Cebadores diseñados para el ensayo de *Análisis de Melting de Alta Resolución*

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de Annealing (°C)
<i>lipL32-H</i>	CCCATTTTCAGCGATTACAGC	TTCCAGGAACAAACGAAACC	163	59.9
<i>ompL1</i>	CGCTCAGTAAATTCGCAACA	TGCAACCGTTGGTATCAAAT	170	58.9
<i>neuB</i>	CGTCTCCGCTTTATAGGTTTG	TTGTATGCCACAACCGATTC	161	59.4
<i>secY-especies</i>	GTCCATAATGATCGCCCAAC	GAAAAATGGTTCAGGCGAAA	164	60.1
<i>secY-serovares</i>	CGTTTGCACCGTTCACTTTA	CGGAGTCCATGGTTCAACTT	213	60.0
<i>wzy</i>	AAATTCCACAAAACGCGAAA	TTTTTGGGGAAGATTGTTCG	217	59.9
<i>lpxC</i>	CCGCAGCTAAAAGATGTTCC	TCCGGCAAAGAAGTCAATCT	190	59.8

Fig

ura

17.

L.interrogans copenhageni M20	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
L.interrogans Australis	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
L.interrogans Bataviae Van Tienen	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
L.interrogans icterohaemorrhagiae RGA	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
Leptospira_interrogans_serovar_Djasiman_str._LT1649	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
Leptospira_interrogans_strain_Akiyami_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
Leptospira_interrogans_strain_Hardjoprajitno_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
Leptospira_interrogans_strain_Hond_Utrecht_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
L.interrogans Bratislava Jez Bratislava	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. L.interrogans Canicola Hond Utrecht	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_kirschneri_strain_5621_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_kirschneri_strain_LT1014_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. L.noguchii LT	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_weilii_strain_LT89-68_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_borgpetersenii_strain_Perepelicin_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_weilii_strain_Cox_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_borgpetersenii_strain_Mus_127_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.
. Leptospira_santarosai_strain_LT117_LipL32_(lipL32)_gene_partial_cds	CCCCAACAGGCGAAATCGGTGA	CCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCGAGAAGAAAAATCA.

Alineamiento del gen *lipL32-H*.

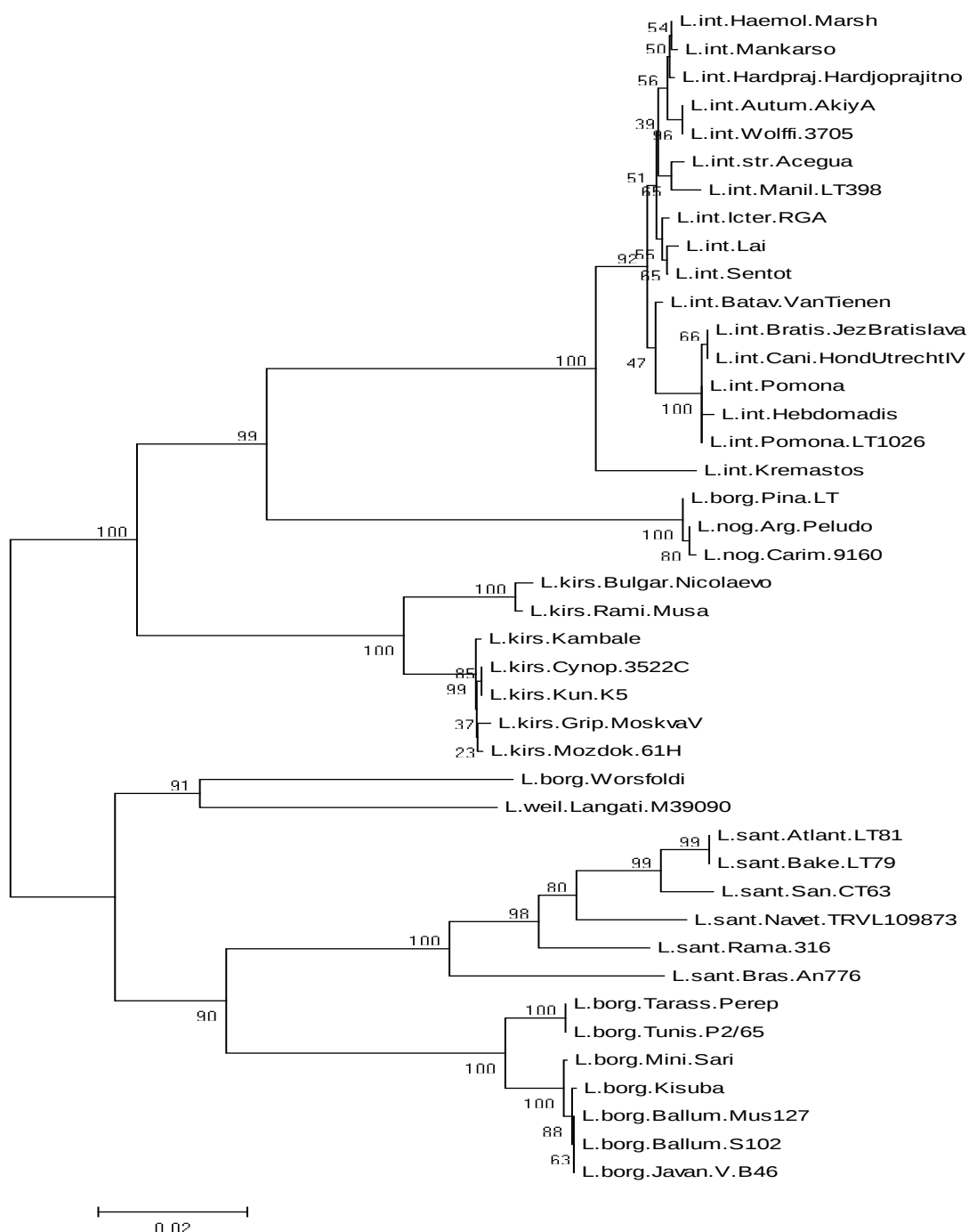


Figura 18. Análisis filogenético de especies de *Leptospira* basado en el gen *lipL32-H*. Construcción basada en el test de Neighbor-Joining con 10 000 repeticiones de bootstrap.

VII.2.1. Identificación de mutaciones silenciosas en los marcadores *lipL32-H*, *secY* y *lpxC*.

Luego de traducir a secuencia de aminoácidos a las secuencias de los genes marcadores *lipL32-H*, *secY* y *lpxC*, se determinó que todas las mutaciones con respecto a la cepa de referencia *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20* eran de tipo silenciosas en el caso del gen *lipL32-H* (Tabla 5). Por otro lado, el gen *lpxC* (Tabla 6) sólo presentó una mutación no sinónima a nivel de la posición 85 (A/G), mientras que en el gen *secY* (Tabla 7) se observaron un total de 7 mutaciones no sinónimas en las posiciones 21 (A/C), 33 (T/A), 34 (C/T), 47 (G/T-A), 56 (G/A), 67 (G/A), 107 (G/T) y 109 (T/G).

Tabla 5. Tabla de mutaciones, indicando el número de mutaciones silenciosas para el marcador *lipL32-H*.

	Mutaciones		
Serovariedad	Secuencia de referencia: <i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	Polimorfismos	No de mutaciones silenciosas
<i>L. interrogans Australis Australis Ballico</i>	50(C/T), 83(T/A)	0	2
<i>L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami</i>	50(C/T), 83(T/A)	0	2
<i>L. borgpetersenii Ballum Mus 127</i>	38(T/G), 41(G/A), 68(C/T), 83(T/A), 89(A/G), 122(T/C)	0	6
<i>L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan</i>	50(C/T), 83(T/A)	0	2
<i>L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava</i>	50 (C/T)	0	1
<i>L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht</i>	41(G/A)	0	1
<i>L. weilii Caledoni Caledoni Caledoni</i>	38(T/G), 41(G/A), 83(T/A), 89(A/G), 122(T/C)	0	5
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	0	0	-
<i>L. kirschneri Cynopteri Cynopteri 3522C</i>	41(G/A), 50(C/T)	0	2
<i>L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman</i>	41(G/A), 83(T/A), 89(A/G), 122(T/C)	0	4
<i>L. santarosai Mini Georgia Lt 117</i>	41(G/A), 56(C/T), 65(C/T), 68(C/T), 71(T/G), 83(T/A), 134(A/T)	0	7
<i>L. kirschneri Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V</i>	41(G/A), 50(C/T), 83(T/A)	0	3
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA</i>	0	0	-
<i>L. noguchii Panama Panama CZ214K</i>	50(C/T), 83(T/A), 146(G/T)	0	3
<i>L. borgpetersenii Trassovi Tarassovi Perepelitsin</i>	38(T/G), 41(G/A), 83(T/A), 89(A/G), 122(T/C)	0	5
<i>L. interrogans Sejroe Wolfii 3705</i>	0	0	-
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso</i>	0	0	-
<i>L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino</i>	0	0	-
<i>L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem</i>	0	0	-

Tabla 6. Tabla de mutaciones, indicando el número de mutaciones silenciosas para el marcador *lpxC*. En negrita: Polimorfismos.

	Mutaciones		
Serovariedad	Secuencia de referencia: <i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	Polimorfismos	No de mutaciones silenciosas
<i>L. interrogans Australis Australis Ballico</i>	1(C/T), 3(C/A), 24(C/T), 126(T/A)	0	4
<i>L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami</i>	1(C/T), 3(C/A), 24(C/T), 126(T/A)	0	4
<i>L. borgpetersenii Ballum Mus 127</i>	1(C/T), 3(C/A), 6(T/C), 15(T/A), 21(A/G), 30(A/G), 33(C/T), 45(T/C), 48(A/G), 66(C/T), 69(A/G), 84(T/C), 87(T/A), 90(C/T), 96(C/A), 102(T/G), 105(T/G), 108(C/T), 111(A/T), 123(G/T), 126(T/A)	0	21
<i>L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan</i>	1(C/T), 3(C/A), 24(C/T), 126(T/A)	0	4
<i>L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava</i>	0	0	-
<i>L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht</i>	0	0	-
<i>L. weilii Calledoni Calledoni Calledoni</i>	-	0	-
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	0	0	-
<i>L. kirschneri Cynopteri Cynopteri 3522C</i>	-	0	-
<i>L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman</i>	1(C/T), 24(C/T), 126(T/A)	0	3
<i>L. kirschneri Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V</i>	1(C/T), 3(C/A), 6(T/C), 15(T/A), 21(A/G), 33(C/T), 45(T/C), 51(T/C), 63(A/G), 66(C/T), 69(A/G), 78(T/G), 84(T/C), 85(A/G) , 87(T/A), 90(C/G), 96(C/A), 102(T/A), 105(T/G), 111(A/C), 117(T/C), 123(G/T), 126(T/A)	1	22
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA</i>	1(C/T), 3(C/A), 24(C/T), 126(T/A)	0	4

<i>L. noguchii</i> Panama Panama CZ214K	1(C/T), 3(C/A), 6(T/C), 15(T/A), 21(A/G), 33(C/T), 45(T/C), 51(T/C), 63(A/G), 69(A/G), 78(T/G), 84(T/C), 85(A/G) , 87(T/A), 90(C/G), 96(C/A), 105(T/G), 111(A/C), 117(T/C), 123(G/T), 126(T/A)	1	20
<i>L. borgpetersenii</i> Trassovi Tarassovi Perepelitsin	-	-	-
<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolfii 3705	0	0	-
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	1(C/T), 3(C/A), 24(C/T), 126(T/A)	0	-
<i>L. interrogans</i> Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	0	0	-
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Pyrogenes Salinem	0	0	-

Tabla 7. Tabla de mutaciones, indicando el número de mutaciones silenciosas para el marcador *secY*. En negrita: Polimorfismos.

Serovariedad	Mutaciones	Polimorfismos	No de mutaciones silenciosas
	Secuencia de referencia: <i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>		
<i>L. interrogans Australis Australis Ballico</i>	73(T/C), 121(G/A)	0	2
<i>L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami</i>	0	0	-
<i>L. borgpetersenii Ballum Mus 127</i>	4(T/C), 10(T/C), 22(G/A), 25(A/G), 28(T/C), 31(A/C) , 33(T/A) , 34(C/T) , 35(G/A), 40(T/C), 46(C/T), 47(G/T) , 52(A/G), 55(T/C), 58(A/G), 64(T/C), 67(T/A), 79(A/T), 91(T/C), 94(T/C), 103(A/G), 109(T/G) , 112(G/A), 115(T/C), 116(T/C), 130(T/C), 133(G/A)	5	22
<i>L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan</i>	73(T/C), 121(G/A)	0	2
<i>L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava</i>	73(T/C)	0	1
<i>L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht</i>	73(T/C), 121(G/A)	0	2
<i>L. weilii Caledoni Caledoni Caledoni</i>	10(T/C), 19(T/C), 22(G/A), 25(A/G), 28(T/C), 31(A/C) , 33(T/A) , 34(C/T), 40(T/C), 46(C/T), 47(G/T) , 52(A/G), 56(G/A) , 58(A/C), 61(C/T), 64(T/C), 67(T/A), 79(A/C), 94(T/C), 98(G/T), 100(A/G), 103(A/G), 112(G/A), 121(A/G), 130(T/C).	4	21
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	0	0	-
<i>L. kirschneri Cynopteri Cynopteri 3522C</i>	16(T/C), 19(T/C), 25(A/G), 34(C/T) , 37(A/G), 40(T/C), 47(G/A) , 52(A/G), 56(G/A) , 67(T/A) , 70(C/T), 79(A/T), 94(T/C), 100(A/G), 103(A/G), 116(T/C), 130(T/C), 133(G/A), 136(C/T), 139(T/C).	4	16

<i>L. santarosai</i> Mini Georgia Lt 117	4(T/C), 10(T/C),19(T/C), 22(G/A), 25(A/G), 28(T/C), 31(A/C),34(C/T) , 37(A/G), 40(T/C), 46(C/T), 47(G/T) , 52(A/G), 56(G/A) , 58(A/T), 64(T/C), 67(T/A), 76(T/C), 79(A/T), 91(T/C), 94(T/C), 100(A/G), 103(A/G), 107(G/T) , 109(T/C), 112(G/A), 115(T/C), 116(T/C), 121(A/G), 130(T/C)	5	25
<i>L. kirschneri</i> Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V	16(T/C),19(T/C),25(A/G), 34(C/T) , 37(A/G), 40(T/C), 47(G/A) , 52(A/G), 56(G/A) , 67(T/A), 70(C/T), 79(A/T), 94(T/C), 100(A/G), 103(A/G), 116(T/C), 130(T/C), 136(C/T), 139(T/C).	3	16
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	67(T/A), 73(T/C), 121(G/A).	3	3
<i>L. noguchii</i> Panama Panama CZ214K	7(G/A),10(T/C), 22(G/A),25(A/G), 34(C/T) , 52(A/G), 61(C/T), 79(A/G), 94(T/C), 100(A/G), 106(G/A), 127(C/T), 136(C/T).	1	12
<i>L. borgpetersenii</i> Trassovi Tarassovi Perepelitsin	4(T/C), 10(T/C),16(T/C), 22(G/A), 25(A/G), 28(T/C), 31(A/C) , 33(T/A) , 34(C/T) , 35(G/A), 40(T/C), 46(C/T), 47(G/T) , 52(A/G), 56(G/A) , 58(A/C), 61(C/T), 64(T/C), 67(T/A), 79(A/T), 91(T/C), 94(T/C), 103(A/G), 109(T/G), 112(G/A), 115(T/C), 116(T/C), 130(T/C), 133(G/A)	5	24
<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolfii 3705	0	0	-
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	0	0	-
<i>L. interrogans</i> Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	0	0	-
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Pyrogenes Salinem	0	0	-

VII.3. Estandarización del análisis HRM en cepas de referencia de *Leptospira* sp.

VII.3.1. Identificación de la temperatura óptima de hibridación.

Como resultado de la estandarización de la temperatura de hibridación de los primers correspondientes a los siete marcadores analizados se obtuvo una temperatura óptima de 50°C.

VII.3.2. Determinación de perfiles de *melting* en cepas de referencia.

Posteriormente, se determinó el perfil de melting para 19 cepas de referencia de *Leptospira* spp., donde, el gen marcador de la lipoproteína *lipL32-H* (Figura 19), generó 9 *clusters* con un nivel de confianza mayor al 90% para cada uno de ellos (Tabla 8). El nivel de confianza se repitió para los demás marcadores, sin embargo, el número de *cluster* generados varió entre ellos: El marcador del gen *secY-1* generó 8 *clusters*; *lpxC*, 5; *secY-2*, 6; *ompL*, 3; *wzy*, 5 y finalmente el marcador del gen *neuB* sólo generó 2 *cluster* (Anexo 3).

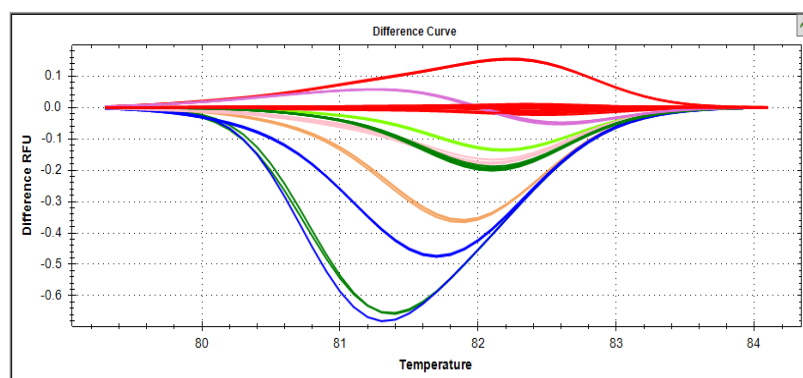


Figura 19. Perfil de *melting* utilizando el marcador *lipL32*, cada color corresponde a un *cluster* distinto (rojo: cluster 8, morado: cluster 9, limón: 6, rosa claro: 7, verde: cluster 2, Palo rosa: cluster 10, azul: cluster 3, verde (extremo inferior): cluster 4, azul (extremo inferior): cluster 5).

De los siete cebadores probados, sólo *lipL32-H*, *secY-1* y *lpxC* fueron considerados para genotipificar serovariedades de *Leptospira* spp. debido a que con ellos se obtuvieron un mayor número de *clusters* formados. De esta manera, cada serovariedad mostró un genotipo, producto de la combinación de los perfiles obtenidos con los tres marcadores. Finalmente, se obtuvieron 15 genotipos, donde 13 de las cepas analizadas albergaban un genotipo único (Tabla 9). El tamaño de los amplificadores de PCR fue verificado mediante electroforesis, y no se observó ningún amplificado inespecífico (Anexo 4).

Tomando en cuenta que la detección del ADN de *Leptospira* sp. se observó en un Cq mayor a 27, se generó un nuevo perfil de *melting*, pero esta vez se utilizó una concentración uniforme de ADN de 10 ng/reacción (10^4 copias/ μ L $\approx$ Cq 27), con el fin de normalizar la concentración de ADN a un valor más cercano al encontrado en las muestras de orina y además porque el análisis de HRM aumenta su eficacia cuando el ADN se encuentra entre 100 pg/ μ L y 20 ng/ μ L. Estos perfiles de *melting* se observan en la Tabla 10, junto a la temperatura de *melting* correspondiente a cada *cluster* generado. La T_m obtenida para los marcadores *lipL32-H* y *secY* oscilaron entre 88.8 °C a 82.2 °C y 75.2 °C a 75.4 °C, respectivamente. Mientras que la T_m del marcador *lpxC* se mantuvo en 72.2 °C.

Tabla 8. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *lipL32*.

Serovariedad	Cluster	Porcentaje de confianza	Serovariedad	Cluster	Porcentaje de confianza
<i>L. interrogans Sejroe Wolfii 3705</i>	Cluster 1	99.3	<i>L. interrogans Autumnalis Akiyami</i>	Cluster 2	91.9
	Cluster 1	99.1		Cluster 2	91.3
	Cluster 1	98		Cluster 2	93
	Cluster 1	97.5		Cluster 2	92.4
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20</i>	Cluster 1	98.7	<i>L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan</i>	Cluster 2	92.2
	Cluster 1	98.9		Cluster 2	92.8
	Cluster 1	97.8	<i>L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman</i>	Cluster 3	86.1
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso</i>	Cluster 1	98		Cluster 3	97.5
	Cluster 1	98.4		Cluster 3	97.1
<i>L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino</i>	Cluster 1	98	<i>L. weilii Calledoni Calledoni Calledoni</i>	Cluster 3	96.8
	Cluster 1	98.1		Cluster 3	98.5
	Cluster 1	98.2		Cluster 4	98.1
<i>L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem</i>	Cluster 1	97	<i>L. santarosai Mini Georgia Lt 117</i>	Cluster 4	98.1
	Cluster 1	98.7		Cluster 4	98.3
	Cluster 1	98	<i>L. kirschneri Cynopteri Cynopteri 3522C</i>	Cluster 5	98
<i>L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA</i>	Cluster 1	95.6		Cluster 5	98.1
	Cluster 1	91.3		Cluster 5	98
	Cluster 1	97.4	<i>L. kirschneri Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V</i>	Cluster 6	98.5
<i>L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava</i>	Cluster 1	97.8		Cluster 6	99
	Cluster 1	95.1		Cluster 6	98.8
	Cluster 1	98.5	<i>L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht</i>	Cluster 7	93.8
<i>L. noguchii Panama Panama CZ214K</i>	Cluster 2	97.3		Cluster 7	96.1
	Cluster 2	92.8		Cluster 7	99.4
	Cluster 2	95.8	<i>L. borgpetersenii Ballum Mus 127</i>	Cluster 8	98.7
<i>L. interrogans Australis Australis Ballico</i>	Cluster 2	92.8		Cluster 8	97.9
	Cluster 2	93		Cluster 8	96
	Cluster 2	95	<i>L. borgpetersenii Trassovi Tarassovi Perepelitsin</i>	Cluster 9	99
<i>L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami</i>	Cluster 2	91.9		Cluster 9	98.7

Tabla 9. Resumen de los clusters generados con seis marcadores y perfil de *melting* obtenido a partir de *lipL32-H*, *secY* y *lpxC*.

Serovares de Referencia	lipL32-H	lpxC	secY-1	secY-2	ompL-1	wzy	Perfil	Genotipo
<i>L. interrogans</i> Australis Australis Ballico	2	2	2	1	2	2	2-2-2	1
<i>L. interrogans</i> Autumnalis Autumnalis Akiyami	2	2	5	1	2	1	2-2-5	2
<i>L. borgpetersenii</i> Ballum Mus 127	8	1	6	1	na	na	8-1-6	3
<i>L. interrogans</i> Bataviae Bataviae Van Tienan	2	2	2	1	2	2	2-2-2	1
<i>L. interrogans</i> Australis Bratislava Jez Bratislava	1	1	8	1	2	2	1-1-8	4
<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola Hond Utrecht	7	1	2	1	1	1	7-1-2	5
<i>L. weilii</i> Caledoni Caledoni Caledoni	3	na	na	na	na	na	3	6
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	1	2	1	1	2	1	1-2-1	7
<i>L. kirschneri</i> Cynopteri Cynopteri 3522C	5	na	na	na	na	na	5	8
<i>L. Interrogans</i> Djasiman Djasiman Djasiman	3	3	1	2	na	na	3-3-1	9
<i>L. santarosai</i> Mini Georgia Lt 117	4	5	7	6	na	5	4-1-7	10
<i>L. kirschneri</i> Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V	6	1	na	4	na	na	6-1	11
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	1	2	3	1	1	3	1-2-3	12
<i>L. noguchii</i> Panama Panama CZ214K	2	4	4	3	3	4	2-4-4	13
<i>L. borgpetersenii</i> Trassovi Tarassovi Perepelitsin	9	1	na	na	na	na	9-1	14
<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolfii 3705	1	1	1	5	1	1	1-1-1	15
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	1	2	1	1	1	1	1-2-1	7
<i>L. interrogans</i> Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	1	2	1	1	1	1	1-2-1	7
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Pyrogenes Salinem	1	2	1	1	1	1	1-2-1	7

Tabla 10. Perfil de *melting* obtenido con *lipL32-H*, *lpxC* y *secY*. Concentración de ADN de 10 ng/reaacción.

Serovares de Referencia	<i>lipL32-H</i>	Tm	<i>lpxC</i>	Tm	<i>secY</i>	Tm	Perfil	Genotipo
<i>L. interrogans</i> Australis Australis Ballico	2	82.2	2	77.2	2	75.4	2-2-2	1
<i>L. interrogans</i> Autumnalis Autumnalis Akiyami	2	82.2	2	77.2	5	75.4	2-2-5	2
<i>L. borgpetersenii</i> Ballum Mus 127	8	82.0	1	77.2	6	75.4	8-1-6	3
<i>L. interrogans</i> Bataviae Bataviae Van Tienan	2	82.2	2	77.2	2	75.4	2-2-2	1
<i>L. interrogans</i> Australis Bratislava Jez Bratislava	1	81.8	1	77.2	8	75.2	1-1-8	4
<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola Hond Utrecht	7	81.8	1	77.2	2	75.4	7-1-2	5
<i>L. weilii</i> Calledoni Calledoni Calledoni	3	81.8	na	--	na	--	3	6
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	1	82.2	2	77.2	1	75.4	1-2-1	7
<i>L. kirschneri</i> Cynopteri Cynopteri 3522C	5	82.2	na	--	na	--	5	8
<i>L. Interrogans</i> Djasiman Djasiman Djasiman	3	82.2	3	77.2	4	75.4	3-3-1	9
<i>L. santarosai</i> Mini Georgia Lt 117	4	81.2	1	77.2	7	75.6	4-1-7	10
<i>L. kirschneri</i> Grippatyphosa Gripatyphosa Moskava V	6	81.4	5	77.2	na	--	6-1	11
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	1	82.2	2	77.2	3	75.4	1-2-3	12
<i>L. noguchii</i> Panama Panama CZ214K	2	82.2	4	77.2	na	--	2-4-4	13
<i>L. borgpetersenii</i> Trassovi Tarassovi Perepelitsin	9	82.4	1	77.2	na	--	9-1	14
<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolfii 3705	1	82.2	1	77.2	3	75.4	1-1-1	15
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	1	82.2	2	77.2	1	75.4	1-2-1	7
<i>L. interrogans</i> Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	1	82.2	2	77.2	1	75.4	1-2-1	7
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes Pyrogenes Salinem	1	82.2	2	77.2	1	75.4	1-2-1	7

Una vez obtenido el perfil a partir de las cepas de referencia se evaluó la correspondencia entre los *clusters* generado por cada marcador y las secuencias de las cepas de referencia mediante alineamientos y la construcción de sus respectivos árboles filogenéticos (Figura 20, Figura 21, Figura 22). En el árbol contruido a partir del marcador *lipL32-H*, el agrupamiento de las cepas *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20*, *L. interrogans Sejroe Wolfii 3705*, *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA*, *L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino*, coincidió con su agrupamiento en el *cluster* 1 obtenido mediante HRM. Lo mismo sucedió para los demás *clusters*, con excepción de la cepa *L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava*, que fue agrupada en el *cluster* 1 por HRM y sin embargo, en el árbol filogenético se encuentra agrupada con la cepa *L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht*, la cual pertenece al *cluster* 7 por HRM. Finalmente, los árboles generados con los marcadores *lpxC* y *secY*, mostraron una mayor coincidencia con los *clusters* generados mediante HRM.

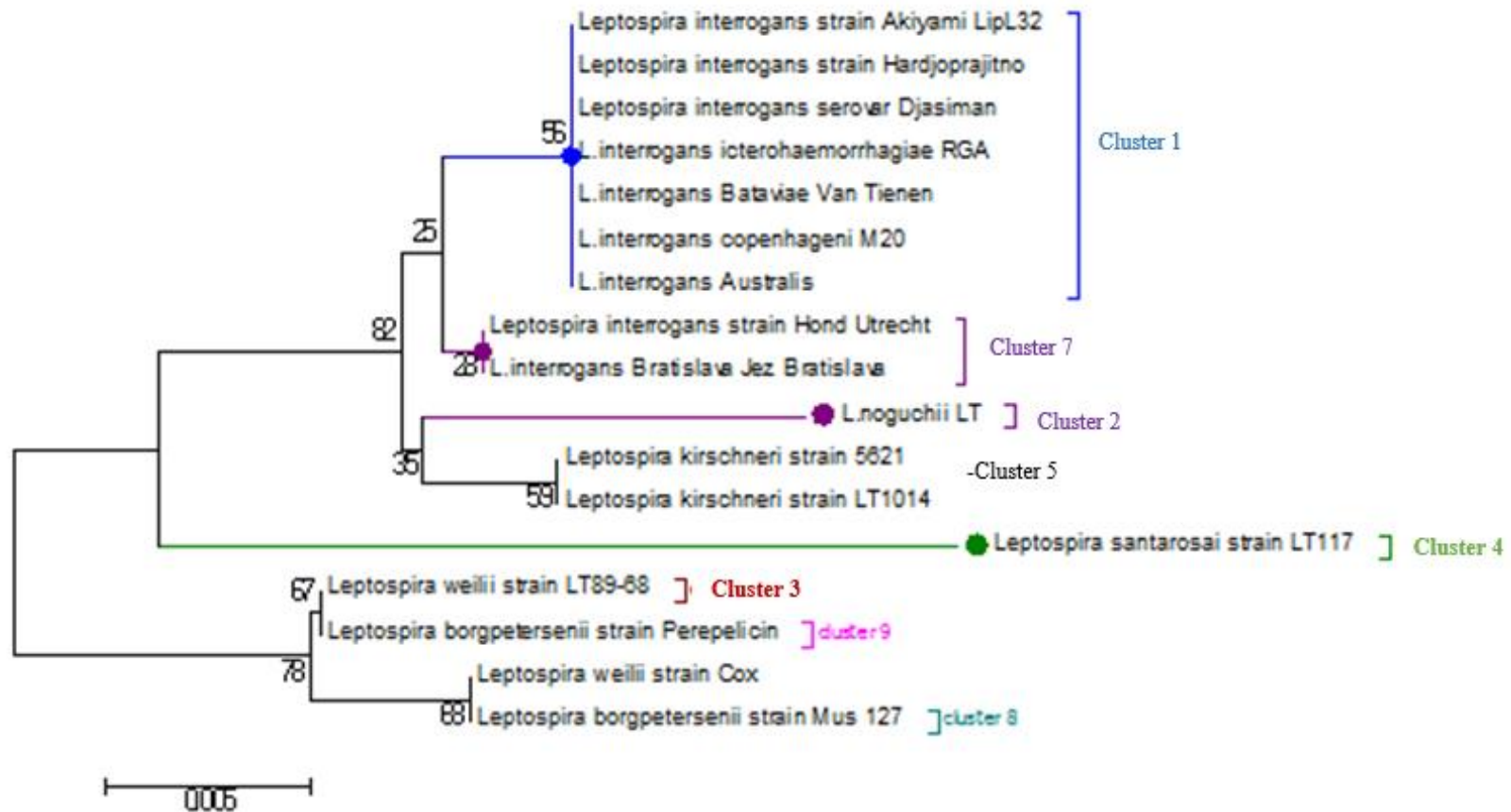


Figura 20. Árbol filogenético generado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los clusters generados mediante *Análisis de Melting de Alta Resolución (HRM)* con el gen *lipL32-H*.

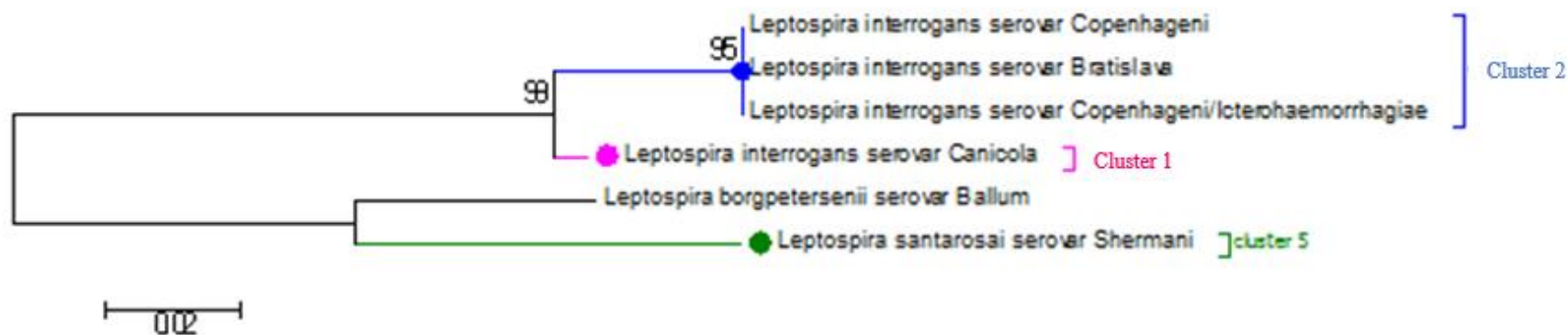


Figura 21. Árbol filogenético generado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los *clusters* generados mediante *Análisis de Melting de Alta Resolución* (HRM) con el gen *lpxC*..

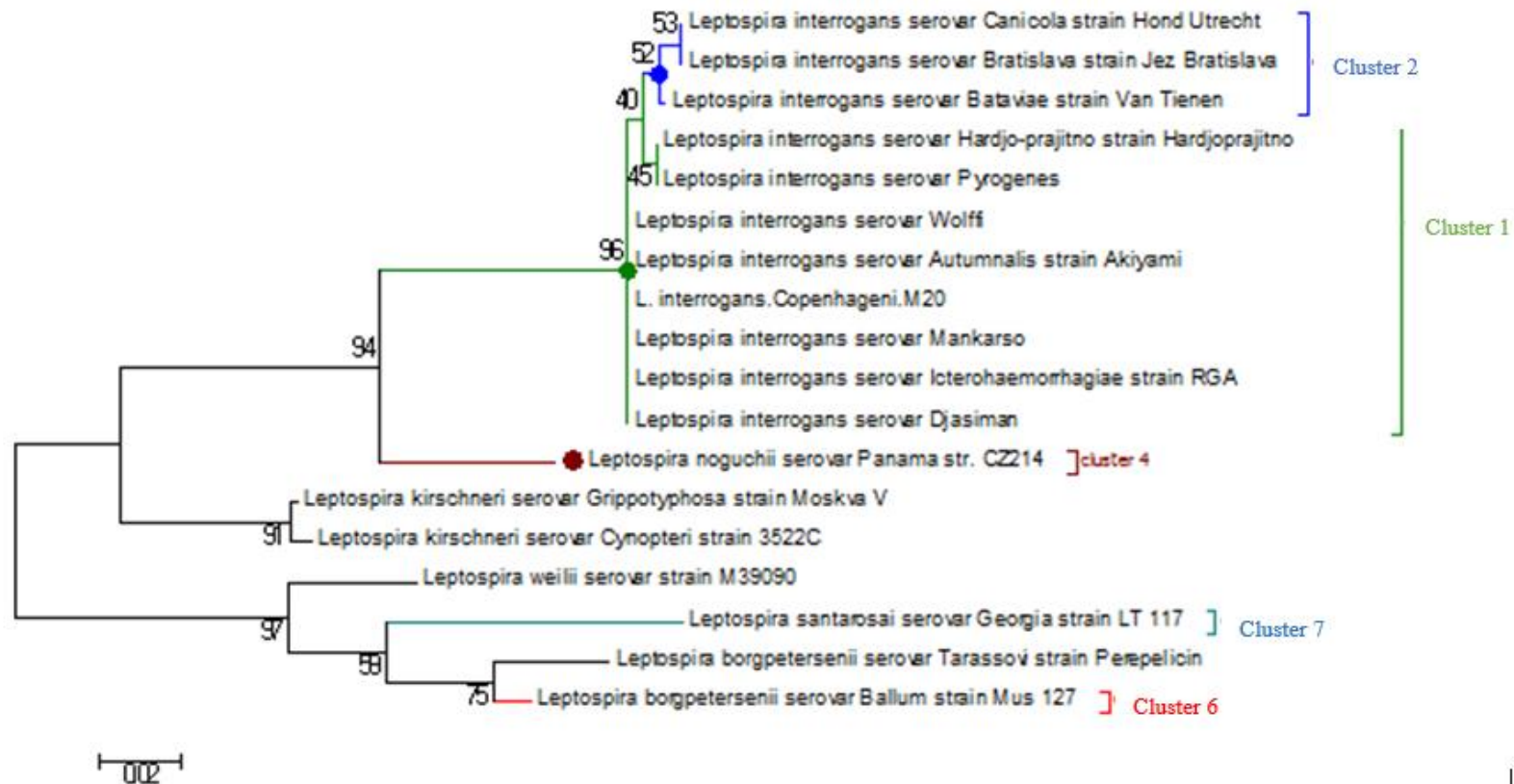


Figura 22. Árbol filogenéticogenerado con las secuencias de las cepas de referencia del estudio y su correspondencia con los *clusters* generados mediante *Análisis de Melting de Alta Resolución (HRM)* con el gen *secY*.

VII.3.3. Sensibilidad del Análisis de Melting de Alta Resolución (HRM)

Se determinó el límite de detección para los cebadores de los tres genes marcadores utilizados en la genotipificación por HRM y los cebadores de detección de *Leptospira* sp. patógena (*lipL32-D*).

Como se observa en la Tabla 11, el número de copias de ADN bacteriano por microlitro obtenidas mediante cuantificación en el PCR se reduce casi 100 veces en comparación al número de bacterias que fueron inoculadas originalmente en la orina de perro y cerdo. Esto sucedió para todos los cebadores analizados y en ambos tipos de orina.

Se consideró como límite de detección la dilución más alta que amplificó por triplicado a una diferencia de S_q menos a 0.4. Es así, que la sensibilidad de la cepa M20 inoculada en orina de perro fue 10^2 bacterias/ μ L para todos los cebadores. En el caso de la orina de cerdo la sensibilidad fue de 10^2 bacterias/ μ L para los cebadores de los genes *lipL32-H* y *lpxC* (HRM) y 10^1 bacterias/ μ L para *secY* (HRM) y *lipL32-D* (Detección).

Sin embargo, se planteó la hipótesis de que la concentración de ADN en la orina podía influenciar un cambio en el perfil de *melting*, modificando el valor del límite de detección. Por lo que se analizó el perfil de *melting* de 7 diluciones seriadas (10^6 bacterias/ μ L a 10^0 bacterias/ μ L) de la cepa *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni* M20 inoculada en orina de perro y cerdo (sanos) vs el perfil de *melting* de 7 diluciones seriadas (10^6 bacterias/ μ L a 10^0 bacterias/ μ L) de la cepa M20 proveniente de cultivo puro en medio EMJH. Se obtuvo que el perfil de *melting* fue el mismo en todas las diluciones provenientes

de cultivo puro, mientras que el perfil de las diluciones inoculadas en orina varió en la dilución 10^0 bacterias/ μL (Figura 23). Esta variación se observó tanto en orina de perros y cerdos.

Finamente, este resultado no cambió los resultados de sensibilidad, ya que ninguno de los valores de límite de detección obtenidos coincide con la dilución donde se produce el cambio en el perfil de *melitng*.

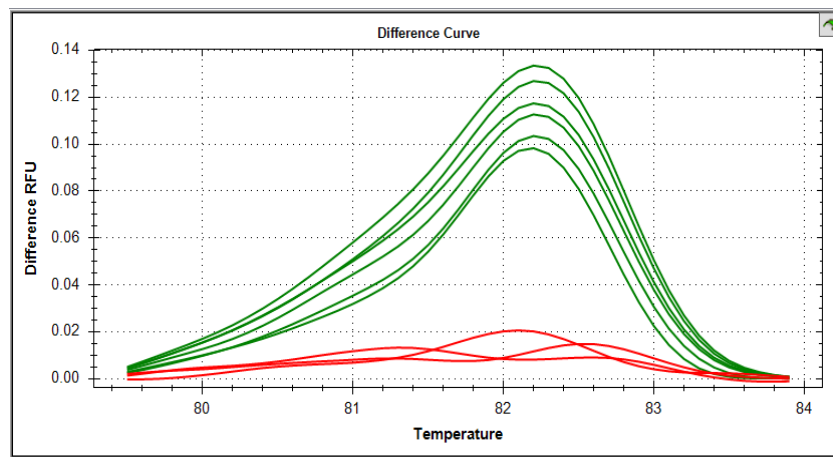


Figura 23. Perfil de la cepa M20 inoculada en orina de perro y cerdo. De verde: Diluciones desde 10^6 bacterias/mL a 10^1 bacterias/mL; de rojo: Dilución de 10^0 bacterias/mL (se muestran las tres repeticiones de la misma dilución)

Tabla 11. Valores de sensibilidad de los cebadores usados en HRM y para detección de *Leptospira* spp. patógena.

CUANTIFICACIÓN OBTENIDA								
ORINA DE PERRO INCOULADA CON <i>Leptospira</i> spp.					ORINA DE CERDO INCOULADA CON <i>Leptospira</i> spp.			
UFC/mL ESPERADO	Análisis de Melting de Alta Resolución (Sq)			Detección (Sq)	Análisis de Melting de Alta Resolución (Sq)			Detección (Sq)
	lipL32-H	lpxC	secY	lipL32-D	lipL32-H	lpxC	secY	lipL32-D
1x10 ⁷	1.43E+05	2.94E+05	4.06E+04	2.15E+05	2.10E+05	3.16E+05	1.00E+05	2.02E+05
1x10 ⁶	1.58E+04	2.38E+04	1.15E+04	2.33E+04	1.94E+04	2.68E+04	1.14E+04	2.49E+04
1x10 ⁵	9.60E+02	1.50E+03	5.96E+02	1.42E+03	1.70E+03	2.53E+03	1.03E+03	2.18E+03
1x10 ⁴	8.12E+01	1.61E+02	3.30E+01	1.32E+02	1.89E+02	3.01E+02	1.50E+02	2.43E+02
1x10 ³	9.67E+00	1.67E+01	5.54E+00	1.44E+01	2.09E+01	3.85E+01	1.48E+01	2.29E+01
1x10 ²	6.72E-01	2.46E+00	3.24E-01	2.09E+00	1.80E+00	2.49E+00	8.55E-01	2.25E+00
1x10 ¹	1.15E-01	2.41E-01	8.90E-02	3.98E-01	2.02E-01	3.45E-01	3.99E-01	4.83E-01
1x10 ⁰	7.03E-02	3.03E-01	8.53E-02	2.59E-01	3.43E-03	N/A	2.33E-01	3.13E-01

VII.3.4. Parámetros de eficiencia del análisis HRM.

La eficiencia de tipificación fue de 100% para el marcador del gen *lipL32-H*, mientras que los marcadores *lpxC* y *secY* presentaron valores de eficiencia de tipificación de 84% y 80%, respectivamente. Sin embargo, todos los marcadores tuvieron una eficiencia de tipificación de 100% dentro de la especie *L. interrogans*. La reproducibilidad fue determinada utilizando las cepas *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20* y *L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava* por 10 repeticiones del análisis. Este valor fue de 100% para todos los marcadores analizados. El índice global de diversidad de la técnica fue de 0.94 (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros de eficiencia y diversidad de los genes marcadores para HRM.

Marcador	Eficiencia de tipificación (Para todas las cepas)	Eficiencia de tipificación (sólo <i>L. interrogans</i>)	Eficiencia de tipificación Global	Reproducibilidad	Índice Global de Diversidad
<i>lipL32-H</i>	100%	100%		100%	
<i>lpxC</i>	84%	100%	84%	100%	0.94
<i>secY</i>	80%	100%		100%	

VII.4. Caracterización de serovariedades de *Leptospira* en muestras de orina de perros y cerdos mediante un sistema HRM.

VII.4.1. Identificación de muestras positivas a *Leptospira* sp. patógena.

Mediante la detección del gen de la lipoproteína *lipL32-D*, 36 muestras (entre perros y cerdos) mostraron un pico de amplificación, sin embargo, se sabe que los cebadores diseñados por Stoddard *et al.*, 2009, pueden amplificar, en algunos casos, una secuencia inespecífica de 150 pb; por lo que fue necesario confirmar que el tamaño de las secuencias amplificadas coincidiera con el esperado para el gen *lipL32-D* de 250 pb, mediante un gel de electroforesis, donde se colocaron las reacciones por triplicado provenientes del PCR. Es así, que de las 36 muestras, 27 presentaron la banda esperada (Figura 24). En estas últimas estaban incluidas las muestras EP24, donde, de las tres reacciones independientes, dos tenían el tamaño esperado; EP60, que presenta tanto la banda esperada como la banda inespecífica en dos reacciones; EP21, la cual presenta en las tres reacciones la banda esperada y la inespecífica y EP211, que presenta dos reacciones con la banda esperada y una con ambos tipos de banda. Mientras que las muestras restantes se consideraron como negativas por pertenecer a amplificados inespecíficos. Adicionalmente, de las 27 muestras que se consideraron positivas, 14 provenían de orina de perros y 13, de orina de cerdos (Tabla 13 y Tabla 14 respectivamente).

Al analizar los datos de T_m y concentración de ADN provenientes de análisis, se observó que sólo nueve de las muestras presentaron más de 1 copia / μ L ($C_q < 34$). Todas las muestras que amplificaron en el análisis presentaron una T_m que oscilaba entre 80.5 y 81.5, la cual correspondía al segmento amplificado, sin

embargo, para tres de ellas (EP24, EP45 y EC201), la Tm no fue determinada por el programa.

Finalmente, las muestras positivas fueron ubicadas en el mapa del sector 20 de Belén y se observan en la Figura 25.

Tabla 13. Muestras de perros positivas a la detección de *Leptospira* sp. patógena.

Nº	Muestras	Cq	Copias/ μ L	Tm
1	EP036	39.48	1.09×10^{-1}	81.50
2	EP021	36.34	1.12×10^0	81.50
3	EP045	38.21	2.62×10^{-1}	Ninguno
4	EP060	29.09	1.64×10^2	81.50
5	EP024	36.38	1×10^0	Ninguno
6	EP206	38.24	4.33×10^{-1}	81.50
7	EP207	37.40	3.11×10^{-2}	81.50
8	EP208	20.17	9.63×10^3	81.50
9	EP209	36.81	3.31×10^{-1}	81.50
10	EP210	28.04	7.31×10^1	81.50
11	EP211	35.79	6.35×10^{-1}	81.00
12	EP212*	36.76	3.31×10^{-1}	81.50
13	EP213	20.38	2.55×10^3	81.50
14	EP214*	36.64	6.04×10^{-1}	81.50

(*): Muestra que no amplificó en el PCR/HRM.

Tabla 14. Muestras de cerdos positivas a la detección de *Leptospira* sp. patógena.

Nº	Muestra	Cq	Copias/ μ L	Tm
1	EC185*	34.34	8.14×10^0	81.00
2	EC165	37.77	1×10^0	81.00
3	EC168	35.56	6.81×10^{-1}	81.00
4	EC183	39.50	3.71×10^{-1}	81.00
5	EC186	34.33	8.14×10^0	80.50
6	EC201	43.73	5.86×10^{-1}	Ninguno
7	EC215	37.36	1×10^0	81.50
8	EC216	35.59	6.81×10^{-1}	81.50
9	EC217	33.97	2.01×10^0	81.50
10	EC218	36.03	5.61×10^{-1}	81.00
11	EC219	22.32	1.86×10^1	81.50
12	EC220*	34.34	8.14×10^0	80.50
13	EC221*	40.43	5.36×10^{-2}	81.00

(*): Muestra que no amplificó en el PCR/HRM.

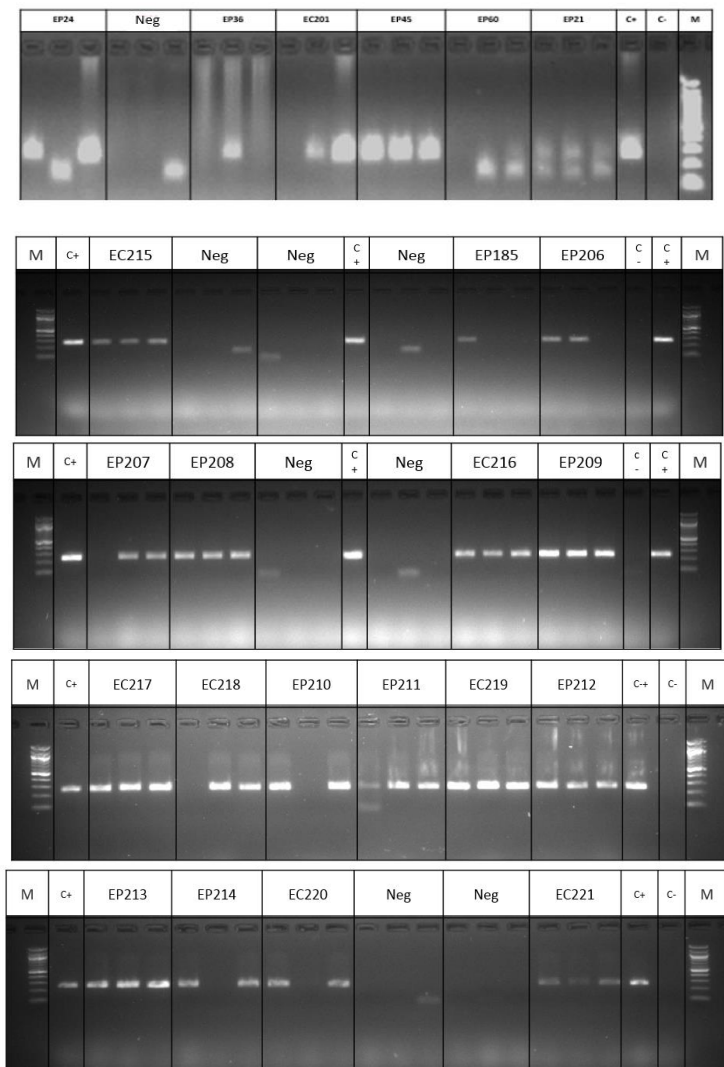


Figura 24. Confirmación de las muestras positivas a *Leptospira* sp. patógena mediante electroforesis. De las 36 muestras provenientes de las reacciones de PCR en triplicado, 27 fueron consideradas como positivas y se muestran por códigos, mientras que las 9 restantes fueron negativas. M: Marcador de 100 pb; C+: Control positivo (250 pb); C-: Control negativo; Neg: Muestras negativas.

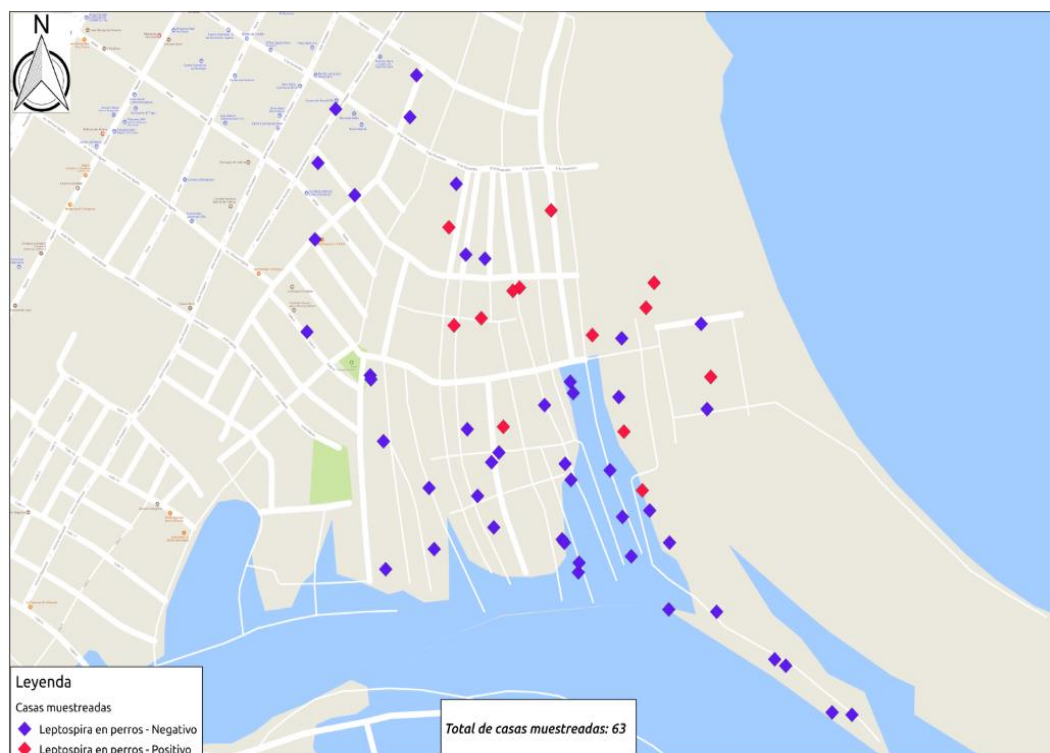


Figura 25. Distribución de las muestras positivas a *Leptospira* patógena en el sector 20 del distrito de Belén. En azul: Muestras negativas. En rojo: Muestras positivas.

VII.4.2. Determinación de los perfiles de *melting* en muestras de orina mediante HRM

De las 27 muestras que resultaron positivas para *Leptospira* sp. patógena, sólo 22 amplificaron para al menos uno de los tres marcadores utilizados. Luego, sólo 11 muestras (entre perros y cerdos) mostraron un perfil de *melting* para los tres marcadores (Tabla 15). Obteniéndose una eficiencia de tipificación de 0.5. Todos los perfiles de *melting* de las muestras positivas correspondieron genotipo de la cepa *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20* inoculada en orina (genotipo 2).

Para las muestras de cerdo, sólo 3 de las orinas positivas amplificaron para los tres marcadores, 2 amplificaron para *lipL32-H* y *lpxC*, 4 amplificaron sólo para *lipL32-H* y 4 no amplificaron para ninguno de los tres marcadores. En el caso de las muestras de perros, 8 amplificaron para los tres marcadores, 2 amplificaron para dos de los marcadores, 3 amplificaron sólo para *lipL32-H* y 1 no amplificó para ninguno de los marcadores utilizados. Los amplificados de las 11 muestras que amplificaron para los tres marcadores se mandaron a secuenciar.

Adicionalmente, para el marcador *lipL32-H*, 5 muestras de cerdo y tuvieron perfiles que no correspondían a ninguno de los obtenidos con las cepas de referencia (10 y 12) y dos muestras (una de perro y otra de cerdo) correspondían al *cluster* de la cepa *L. kirschneri* *Grippatyphosa* *Gripatyphosa* *Moskava* V. Debido a esto, los amplificados de estas 7 muestras también fueron secuenciados.

Para corroborar que la secuencia de las 11 muestras corresponde a las secuencias de las serovariedades que presentan el genotipo número dos, se generó un alineamiento de dichas muestras con todas las secuencias de las serovariedades analizadas en este estudio. Finalmente se generó un árbol filogenético que confirmó los resultados del HRM (Figura 26, Figura 27 y Figura 28) y permitió observar la cercanía genética de las muestras que presentaron un perfil distinto para el marcador *lipL32-H*. Es así, que las muestras que pertenecían al *cluster* 10 (consenso 12 y 13 en el árbol) tenían la misma secuencia correspondiente a *L. santarosai*, mientras que la muestra que pertenecía al *cluster* 12 correspondía a la secuencia de la especie *L. noguchii* (consenso 17).

Tabla 15. Genotipos identificados en las muestras de perros (EP) y cerdos (EC).

N°	MUESTRA	lipL32-H	lpxC	secY-1	PERFIL	GENOTIPO
1	EC165	10*	na	na	ND	ND
2	EP168	1	na	na	ND	ND
3	EP183	1	2	1	1-2-1	2
4	EC186	10*	na	na	ND	ND
5	EP024	1	2	1	1-2-1	2
6	EP021	1	2	1	1-2-1	2
7	EP060	1	2	1	1-2-1	2
8	EC215	5	na	na	ND	ND
9	EC206	10*	na	na	ND	ND
10	EP045	1	na	na	ND	ND
11	EP036	1	2	1	1-2-1	2
12	EC201	12*	2	na	ND	ND
13	EP207	1	2	na	ND	ND
14	EP208	1	2	1	1-2-1	2
15	EC216	10*	2	na	ND	ND
16	EP209	1	na	na	ND	ND
17	EC217	1	2	1	1-2-1	2
18	EC218	1	2	1	1-2-1	2
19	EP210	1	2	1	1-2-1	2
20	EP211	5	na	1	ND	ND
21	EC219	1	2	1	1-2-1	2
22	EP213	1	2	1	1-2-1	2

na: No hubo amplificación

ND: No definido.

(*): *Clusters* definidos en el análisis de las muestras

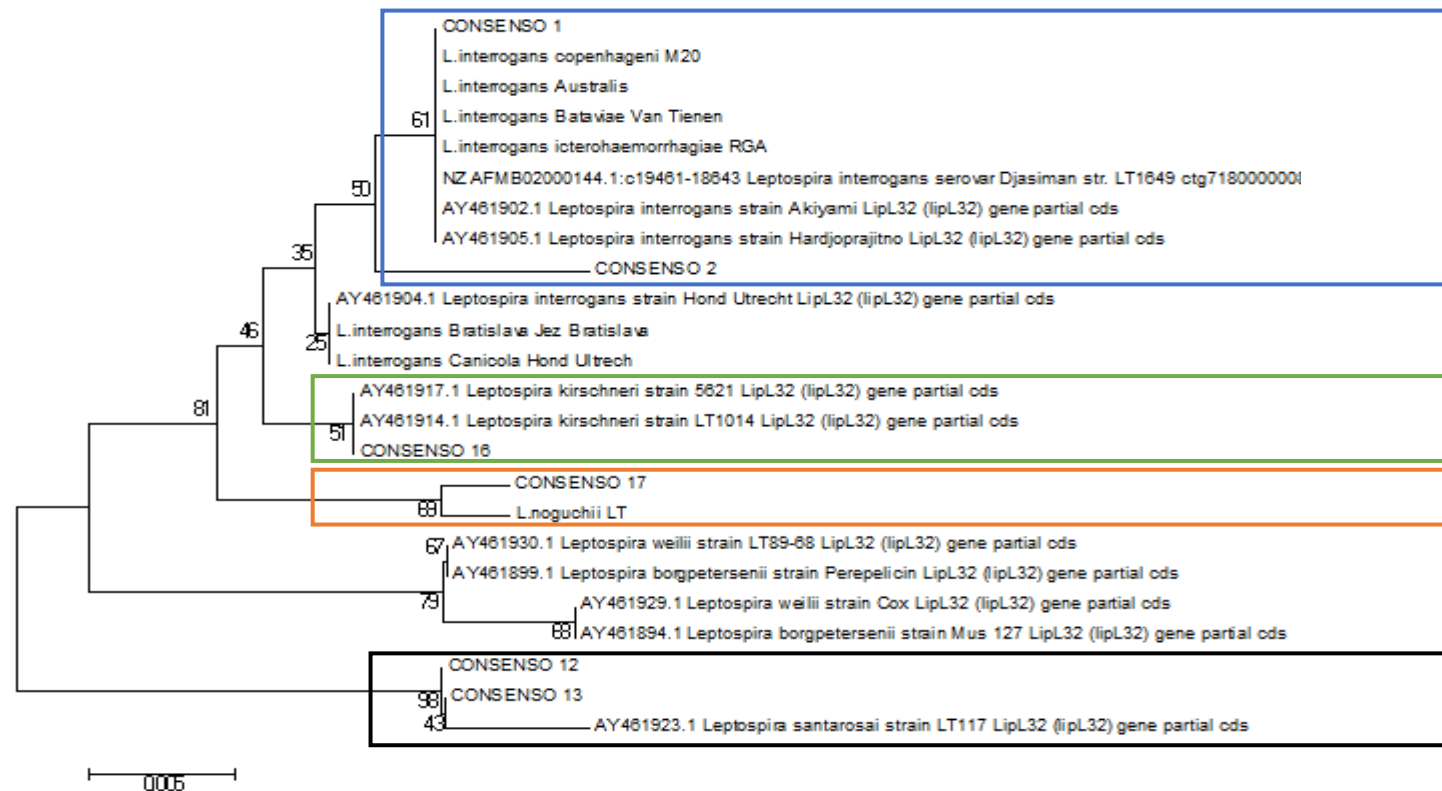


Figura 26. Árbol filogenético de *lipL32-H* con cepas de referencia y muestras. Secuencias consenso 1 Y 2 corresponden al grupo de cepas pertenecientes al *cluster* 2 (azul). Consenso 16 corresponde a la especie *L. kirschneri* (verde); consenso 17, a la especie *L. noguchii* (naranja) y consensos 12 y 13 a la especie *L. santarosai* (negro).

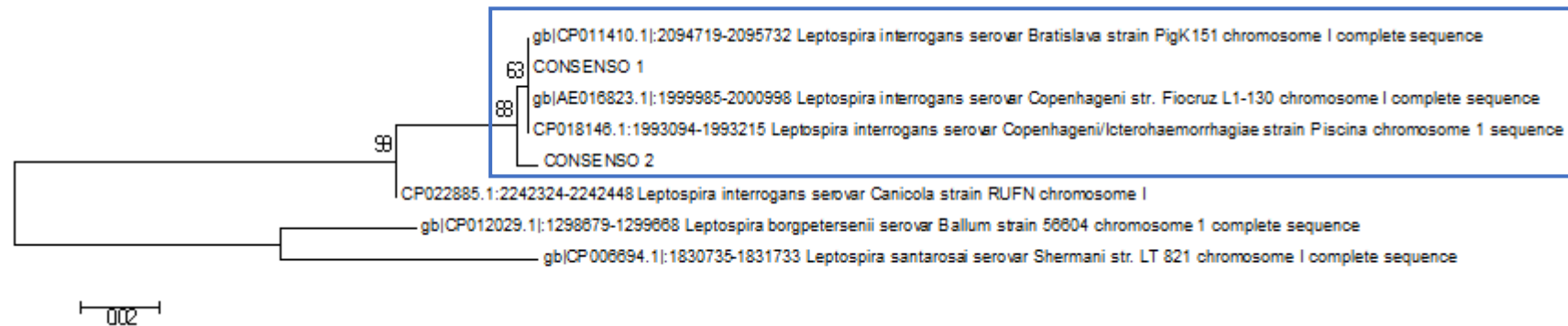


Figura 27. Árbol filogenético de *lpxC* con cepas de referencia y muestras. En azul, secuencias consenso 1 Y 2 corresponden al grupo de cepas pertenecientes al *cluster* 1.

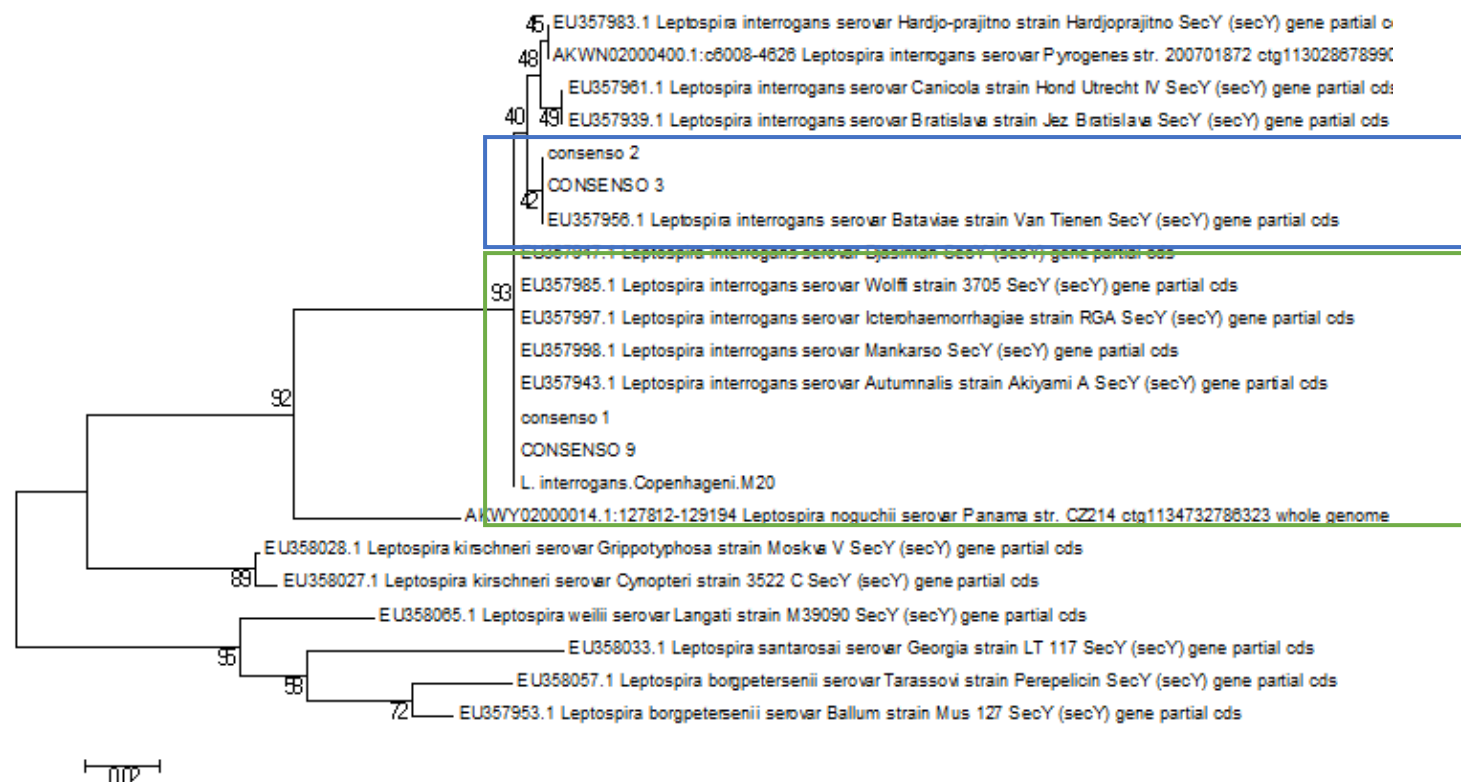


Figura 28. Árbol filogenético de *secY* con cepas de referencia y muestras. Secuencias consenso 2 y 3 corresponden una serovariedad perteneciente al *cluster* 3 (azul). Consenso 1 y 9 corresponde al grupo de las especies del *cluster* 2 (verde).

VIII. DISCUSIÓN.

VIII.1. Colecta de las muestras.

En un estudio realizado en diferentes distritos dentro de la región Loreto, que incluyó a Belén, se identificaron dos principales factores de riesgo para la positividad a Leptospirosis: Nivel de educación, el cual iba acompañado de una escasa higiene, y localización de las viviendas cerca al río (Johnson *et al.*, 2004). Durante el censo y colecta de muestras en este estudio, se observó la falta de concientización e información que tienen los pobladores con respecto a leptospirosis, debido a la costumbre generalizada de utilizar el agua de río tanto para bañarse, como para el consumo humano y lavado de alimentos. Por otro lado, el hacinamiento de las casas en el sector 20 del distrito, generaba que el agua del río no fluya de manera natural, convirtiendo varias zonas en un estanque, donde las personas mantienen las mismas costumbres antes mencionadas, a pesar del evidente estado insalubre del agua.

Por otro lado, durante la colecta de la orina de los perros se pudieron detectar algunos posibles factores de riesgo que los expondrían a una infección con la bacteria. Muchos de los habitantes que tienen mascotas en casa evitan darles agua durante las inundaciones debido a la disponibilidad del agua del río, exponiendo a sus mascotas a actuar como reservorios de la bacteria. Ello aumenta gracias al nivel de estrés provocado por el encierro y escaso desplazamiento de los animales durante la crecida del río. Adicionalmente, se observó que algunos de estos perros eran capaces de nadar, aumentando su contacto con el agua favoreciendo la posible transmisión de la enfermedad.

En el caso de los cerdos, la colecta tuvo algunas dificultades ya que las personas se negaban a corroborar su condición de criadores de dichos animales, debido a que esta actividad está prohibida por el municipio del distrito. En consecuencia las muestras de orina de cerdo se obtuvieron de los mataderos clandestinos que operan de madrugada. En estos lugares, los encargados de extraer las vísceras a los animales muertos estaban descalzos todo el tiempo, y operaban en una balsa que se encontraba en constante contacto con el agua y con los fluidos del animal. Dichas vísceras eran eliminadas en el agua de río o se utilizaba para alimentar a los perros guardianes.

Una de las dificultades durante el procedimiento de toma de muestra de orina en perros, era que las sondas urinarias no era lo suficientemente pequeñas para facilitar la entrada a la uretra de las hembras, por lo que hubo muchos intentos fallidos en la colecta de orina, obteniéndose un número de muestras en hembra menos al de los machos. Sin embargo, la aplicación de citocentesis, redujo considerablemente el problema, pero su éxito dependió mucho de la destreza del veterinario.

Finalmente, debido al alto grado de dificultad de la toma de muestra, no se obtuvo el número de muestral requerido para validar la técnica de tipificación propuesta en este estudio. Dicho número se calculó utilizando un nivel de significancia de 95%, una potencia de 85% y un valor de prevalencia referencial de 10% en perros y 30% en cerdos, lo que resultaba en un total de 140 perros y 120 cerdos requeridos para el estudio. Sin embargo, sólo se lograron coleccionar 63 muestras de orina de perros distribuidas en las 107 manzanas del distrito de Belén, y 88 muestras de orina de cerdos provenientes de los mataderos informales.

VIII.2. Selección de genes marcadores.

Para tipificación de *Leptospira* en muestras de orina de cerdos (88) y perros (63) de Belén en Iquitos independiente de cultivo, se utilizó la técnica de tipificación basada en un *melting* de alta resolución (HRM) la cual es rápida, sencilla, presenta un alto grado de especificidad y ha sido utilizada en para la identificación de variantes genéticas de diversos microorganismos, entre ellos *Brucella* spp. (Winchell *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus* (Stephens *et al.*, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Naze *et al.*, 2010) y algunos tipo de adenovirus (Steer *et al.*, 2008). Adicionalmente, con el objetivo de estrechar la relación entre la serología de la bacteria y métodos moleculares de diagnóstico, el sistema HRM se trabajó con regiones genéticas que influyan directamente en la reactividad serológica de *Leptospira*; de esta forma se amplifica la adquisición de datos serológicos, epidemiológicos y genéticos mientras se utiliza una prueba molecular rápida (Agampodi *et al.*, 2013); por lo que se identificaron genes marcadores que estén asociados a la antigenicidad de la bacteria.

Debido a que los genes de las lipoproteínas y los genes implicados en la síntesis de LPS son un blanco preferido para el diagnóstico y tipificación molecular (Bulach *et al.*, 2000), se eligieron genes marcadores que sólo se encuentran presentes en las variedades patógenas de *Leptospira* y que correspondan a las características antes mencionadas. Así mismo, se incluyó un gen *lpxC*, que participa en la síntesis del Lípido A, que está asociado a la toxicidad de la bacteria. Los árboles filogenéticos elaborados durante la selección de los genes marcadores arrojaron que el marcador del gen *lipL32* y *secY* mostraron un mejor agrupamiento. Esto se debe a que *lipL32*, pertenece a un grupo de lipoproteínas

que tienen función de adherencia, cuyos roles en la adaptación de la bacteria a diferentes ambientes y hospederos es hasta ahora una especulación, sin embargo, la mayoría de ellas tienen una presencia restringida a ciertas especies de *Leptospiraes*, mientras que *lipL32* se ha observado en todas las especies patógenas de la bacteria (Fouts *et al.*, 2016), adicionalmente, se ha descrito un aumento significativo de su expresión durante el proceso de infección en mamíferos en comparación con otras lipoproteínas (Haake *et al.*, 2000), como también su capacidad de adherirse al plasminógeno y a proteínas reguladoras del sistema de complemento (Xu *et al.*, 2016). Por otro lado, SecY, es una proteína translocasa que permite el transporte de lipoproteínas hacia la membrana externa de *Leptospira* sp. (Ko *et al.*, 2009) y se encuentra sólo en especies patógenas de la bacteria, además de que es uno de los genes que ha sido utilizado como marcador en análisis filogenéticos de *Leptospira* sp. por su alto grado de conservación.

Por otro lado, a pesar de que el agrupamiento observado en los árboles filogenéticos construidos en base a secuencias nucleotídicas, en este estudio, corresponde con los patrones de agrupación de especies observados en estudios filogenéticos que utilizaron como marcadores secuencias aminoacídicas de los genes *lipL32* y *secY* (Balamurugan *et al.*, 2013; Fouts *et al.*, 2016; Gamberini *et al.*, 2005), se observó que los polimorfismos analizados eran en su mayoría mutaciones silenciosas. Las mutaciones silenciosas, son aquellas que no alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida, y para que la presencia de estas no afecte posteriormente el perfil de *melting*, deberían tener tasas de mutación bajas. Sin embargo, sólo se sabe que el gen *lpL32* es el segundo gen más conservado entre especies dentro del género *Leptospira* después del gen 16S

RNAr (Vedhagiri *et al.*, 2009) y *secY* es uno de los genes más conservados dentro de las bacterias Gram negativas (Boonsilp *et al.*, 2013). Mientras que el grado de conservación del gen *lpxC* es desconocido, sin embargo, se sabe que codifica a una de las trece enzimas encargada de la síntesis del Lipido A, cuya estructura es altamente conservada en el género *Leptospira* (Nahori *et al.*, 2005).

Una posible razón del por qué estas mutaciones silenciosas generan una agrupación de especies que coincide con estudios de filogenia, es el fenómeno observado en bacterias denominado codón *bias* (Lyons y Lauring, 2017), donde mutaciones silenciosas dentro de un codón suelen fijarse en la población bacteriana. Se conoce muy poco acerca de los factores que inducen a este codón *bias*, sin embargo, se ha observado que en bacterias Gram negativas como *E. coli*, existe una predisposición a la fijación de mutaciones silenciosas (dentro de los primeros 30 bp en el ARMm) cuya secuencia facilita la formación de estructuras secundarias que confieren una mayor afinidad al ribosoma durante la traducción; así también, existen mutaciones silenciosas que se fijan entre los 100-150 pb del ARNm y promueven un lento desplazamiento del ribosoma, lo que asegura un proceso de traducción sin errores (Plotkin y Kudla, 2011), favoreciendo la expresión de determinados genes.

VIII.3. Estandarización del análisis HRM en cepas de referencia.

La evaluación de los marcadores dentro de un sistema de genotipificación de serovariedades de *Leptospira* sp. patógena a partir de muestras de orina de reservorios, se llevó a cabo utilizando una técnica específica y reproducible. El análisis HRM estandarizado en este estudio tuvo un buen valor de

reproducibilidad (100%), los valores de eficiencia de tipificación (84%) e índice de discriminación (0.94) fueron bajos ya que no todas las serovariedades de referencia fueron discriminadas a nivel de serovariedad (15/19: 84%). La baja eficiencia de tipificación se debió a que los cebadores de los genes *lpxC* y *secY* no fueron capaces de amplificar en todas las cepas utilizadas en el estudio, a pesar de ajustar la concentración de ADN a la sugerida en un ensayo de HRM (5 a 10 ng/ μ L) y probar diferentes concentraciones de cebadores, una de las razones de que suceda ello, puede deberse al bajo contenido de GC en dichos cebadores que oscilaba que fue de 42 % y 28% para *lpxC* y *secY*, respectivamente. Por otro lado, bajo las condiciones normales y altas de salinidad, no se observó un cambio significativo en los valores de ΔG *in silico* (variación en la energía libre), por lo que disminuye la probabilidad de que se hayan formado estructuras secundarias o dímeros que impidan una correcta amplificación, meno aun usando un kit de purificación comercial automatizado y eficiente como el que se usó en este estudio. Pro otro lado, se podría especular que las cepas que no amplificaron para dichos marcadores hayan mutado en las regiones de complementariedad con el cebador producto de los pasajes seriados a los que se someten cada dos semanas para su mantenimiento, sin embargo esto sólo podría ser posible en el caso del marcador *lpxC*, ya que es un gen reportado recientemente en el género *Leptospira* que existe en una sola copia del gen en el genoma y no se tiene información de su grado de conservación ni si está sometido a presión de selección.

Por otro lado, el bajo índice de discriminación pudo deberse a que la tipificación serológica no sólo está basada en las proteínas de membrana sino en la secuencia de carbohidratos presente en los lipopolisacáridos en membrana externa (Smythe

et al., 2009), lo que no siempre permite una buena correlación entre la identificación serológica y los métodos moleculares que utilizan el análisis de secuencias de ADN.

Aunque, por sí solo, ningún marcador diferenció efectivamente a cada una de las 19 serovariedades analizadas (*lipL32*-H= 9 clusters; *lpxC* = 4 clusters; *secY* = 6 clusters), el marcador *lipL32* tuvo una eficiencia de tipificación del 100 %, lo que permitiría utilizarlo en un primer paso en la tipificación, y en función a los resultados obtenidos aumentar el nivel de discriminación utilizando los otros dos genes del sistema. Por otro lado, el agrupamiento de las serovariedades analizadas por HRM mostró concordancia con el obtenido mediante el análisis filogenético realizado durante la selección de los marcadores (Figura 20, Figura 21 y Figura 22).

Los análisis moleculares como MLST, MLVA, PFGE y HRM, pueden reportar diferentes niveles de discriminación de *Leptospira* dependiendo del método utilizado. Por ejemplo, los serovares Pomona y Gatarula poseen un mismo perfil en la tipificación por MLST, pero pueden ser diferenciados mediante PFGE (Galloway y Levett, 2008). En el caso de *L. interrogans*, se aprecia una diferenciación entre las serovariedades Copenhageni e Icterohaemorrhagiae mediante el análisis HRM reportado en este estudio, sin embargo, estas serovariedades son indistinguibles al utilizar las técnicas de MLVA y PFGE (Naze *et al.*, 2015). En consecuencia, estos métodos moleculares podrían utilizarse de manera complementaria para mejorar la precisión en la tipificación, lo cual es una ventaja ya que en la actualidad ningún método molecular cumple todos los requisitos requeridos para determinar de manera inequívoca y con una

alta resolución a los aislados de *Leptospira* provenientes de pacientes o reservorios silvestres y domésticos.

Por otro lado, se conocen 200 serovariedades patógenas dentro del género *Leptospira*, sin embargo, durante la validación de los distintos métodos moleculares de tipificación se utilizaron entre 50 a 100 serovares, los cuales presentaban la mayor prevalencia a nivel mundial (Naze *et al.*, 2015). Esto representa una limitante en este estudio, ya que sólo se analizaron 19 serovariedades patógenas, las más prevalentes en el país. Por este motivo, los genotipos obtenidos sólo reflejan la discriminación de las serovariedades utilizadas más no de todas las existentes.

Adicionalmente, los perfiles de *melting* obtenidos para cada serovariedad no estarían completamente relacionados al fenotipo de la bacteria debido a la gran cantidad de mutaciones silenciosas encontradas en los polimorfismos analizados; asociación que se quería demostrar utilizando marcadores que participaran en la antigenicidad de *Leptospira*. Estas mutaciones podrían haberse fijado en estos genes regulando su expresión como se explicó anteriormente, sin embargo, esta teoría sólo puede ser confirmada mediante un análisis poblacional que evidencie la fijación de mutaciones silenciosas en los genes de *Leptospira* analizados en este estudio.

VIII.4. Sensibilidad del HRM.

A pesar de que MLST y MLVA son las técnicas moleculares han demostrado proveer un mayor información respecto a la identificación de especies (Ahmed *et al.*, 2006), éstas requieren de reactivos costosos y grandes cantidades de ADN de

buena calidad, lo que está sujeto a un previo aislamiento de la bacteria en cultivo puro a partir de la muestra clínica, impidiendo un diagnóstico directo a partir de muestras cuya carga bacteriana es baja y presenta impurezas, como es el caso de la orina (Majed *et al.*, 2005). Actualmente, se busca que el análisis de MLST pueda ser utilizado directamente en muestras de suero, pero la sensibilidad obtenida ha sido muy baja: 10^3 bacterias/mL a 10^4 bacterias/mL (Datos no publicada). Mientras que la sensibilidad de los cebadores utilizados en el análisis HRM de este estudio, osciló entre 10^1 bacterias/ μ L y 10^2 bacterias/ μ L, en comparación con el reportado por Naze *et al.*, 2015, que fue capaz de detectar hasta 1 bacteria/ μ L, en un estudio donde detectó serovariedades de *Leptospira* a partir de muestras de suero de pacientes febriles mediante HRM utilizando como marcadores a secuencias VNTR (número variable de repeticiones en tándem), sin embargo, la diferencia entre este estudio y el de Naze radica en el tipo de muestra utilizada y en el tratamiento de la misma, donde se pierde una alta carga bacteriana producto del proceso de eliminación de cristales en la orina.

Finalmente, sólo se evidenció un cambio en el perfil de *melting* sólo en muestras con carga bacteriana menores o iguales a 10^0 bacterias/ μ L, lo que no modifica el resultado de sensibilidad obtenida en este estudio.

VIII.5. Caracterización de serovariedades de *Leptospira* spp. en muestras de orina de perros y cerdos mediante el sistema HRM.

Positividad a *Leptospira* sp. patógena asociada al reservorio.

Como primer paso en la caracterización de serovariedades de *Leptospira* spp. en muestras se identificaron las aquellas que eran positivas a la presencia de la

bacteria. Se encontró que el 22 % (14/63) de las muestras de perros del distrito de Belén, fueron positivas para *Leptospira* sp. patogénica mediante PCR cuantitativo utilizando como marcador el gen *lipL32-D*, siendo este, el primer estudio realizado en este distrito. Por otro lado, los estudios de diagnóstico de *Leptospira* patógena en muestras de orina en perros que han utilizado técnicas basadas en PCR convencional reportan prevalencias de 0.5-1 % (Gentilini *et al.*, 2015). En el Perú, la seroprevalencia en muestras de suero de perros domésticos de Chancay-Lima donde se utilizó diagnóstico por MAT, es de 27.8% (Céspedes *et al.*, 2007), debido a que los anticuerpos contra la bacteria permanecen en la sangre aun cuando la leptospirosis es ausente.

La mayoría de las muestras positivas presentaron un Cq mayor a 34 ($\sim 5 \times 10^0$ copias/reacción). Esta baja cantidad de copias puede estar relacionada a la pérdida de bacteria durante el procesamiento de las muestras de orina, ya que antes de la extracción de ADN, las muestras deben someterse a dos centrifugaciones para eliminar el exceso de cristales que podría dañar el ADN y disminuir la eficiencia del HRM (Wittwer *et al.*, 2003). Esto se observa en los valores obtenidos en el análisis de sensibilidad para el marcador *lipL32-D*, con una disminución de 100 veces el número de copias presentes inicialmente en la orina. Ello se convierte en una gran limitación, ya que al disminuir la concentración de ADN, existe una mayor probabilidad de que no sea detectado eficientemente en el ensayo de PCR.

Para el caso de los cerdos, no se han reportado aún estudios en el diagnóstico directo a partir de orina utilizando técnicas de PCR, sin embargo existen datos de seroprevalencia como el reportado por Liceras y *col.*, donde el 25 % de los cerdos provenientes de mataderos en la ciudad de Huánuco resultaron positivos a la

prueba de MAT (De Hidalgo *et al.*, 1981). En la región Loreto, los estudios de seroprevalencia sólo se han dado a nivel de sajinos, reportando valores de 90% (Becerra y Patricia, 2004), mientras que un estudio hecho en mataderos de Lima reportó el 85% (Anampa *et al.*, 2012). En el presente estudio el 15% (13/88) de los cerdos provenientes de los criaderos en Belén resultaron positivos a *Leptospira* patógena mediante la detección del marcador *lipL32-D*, esto implicaría que a pesar de que los cerdos están más propensos a infectarse con la bacteria, la leptospirosis no es común o no se extiende por tiempos prolongados, una de las razones por las que ocurriría esto estaría vinculada al tipo de serovariedad que haya infectado al animal, es así, que si se trata de una variedad no adaptada al hospedero la bacteria se elimina por la orina en cortos periodos de tiempo (Llewellyn *et al.*, 2016).

Determinación de los perfiles de melting de *Leptospira* spp. en muestras de orina mediante HRM.

De un total de 27 muestras positivas (entre perros y cerdos) a *Leptospira* patógena, 22 amplificaron por lo menos uno de los tres marcadores utilizados en el análisis HRM, mientras que 5 de ellas no amplificaron para ninguno (EP212, EP214, EC220, EC221, EC185) (Tabla 13 y Tabla 14). Esto no estuvo relacionado con la cantidad de ADN presente en la orina, ya que muestras como EC185 y EC220 presentaron más de 10^0 copias de genoma/ μ L en comparación con muestras que tenían una menor carga bacteriana y aun así fueron detectadas durante el HRM. Una posible razón de la ausencia de amplificados en estas muestras es la calidad de las mismas, ya que la orina puede contener gran cantidad de cristales capaces de inhibir la reacción de PCR.

En relación a la eficiencia de tipificación de la técnica HRM en muestras (50%-11/22), esta supera al reportado en un estudio donde se identificaron serovariedades patógenas de *Leptospira* spp. a partir de muestras de suero de pacientes infectados con la bacteria (40%) (Naze *et al.*, 2015b), tomando en cuenta que las muestras de orina tienen mayores contaminantes que pueden interferir en el PCR comparadas con muestras de suero.

Por otro lado, el restante 50% de las muestras sólo amplificaron para dos de los tres marcadores analizados, debido al bajo porcentaje de eficiencia de tipificación obtenido para *lpxC* (64%-14/22) y *secY* (56%-12/22) comparado con el marcador *lipL32-H* (77%-17/22), donde quince de las muestras correspondían al *cluster* 1 y dos muestras al *cluster* 5 (*L. kirschneri* *Grippatyphosa* *Grippatyphosa* *Moskava* V). Mientras que cinco de ellas se agruparon en dos nuevos *clusters* (10 y 12).

En el caso de las muestras, la eficiencia tipificación es menor que la obtenida en las cepas de referencia, ello puede deberse a dos razones, una de ellas, es la baja eficiencia de los cebadores que se ha discutido anteriormente y la otra es que para el diseño de los mismos se tomó como referencia las secuencias de referencia disponibles en GenBank, sin embargo, no todos los aislados ni todas las especies reportadas hasta la fecha están disponibles en dicha base de datos. Por esta razón, se puede plantear un análisis adicional de dichas muestras que no amplificaron utilizando nuevos cebadores que se unan a regiones conservadas y amplifiquen una secuencia más grande donde se encuentre contenido el gen que no pudo ser detectado.

Las muestras de perros identificadas correspondían al genotipo 2 (perfil 1-2-1), que coincide con las serovariedades con mayor prevalencia en humanos pertenecientes al distrito de Belén- Iquitos (Datos no reportados), estas son: *L. interrogans Australis Ballico*, *L. interrogans Autumnalis Akiyami*, *L. Interrogans Djasiman* y *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20*. Por otro lado, *L. kirschneri Grippatyphosa Moskava V* también es otra serovariedad frecuente en pobladores de Belén (Datos no reportados) y que fue encontrada en una de las muestras de perro que sólo amplificó para el marcador *lipL32-H*.

Estos resultados muestran que los perros domésticos comparten las mismas serovariedades prevalentes en las personas de dicho distrito. Sin embargo, en este estudio no se tomaron muestras de suero de los dueños, que puedan corroborar la hipótesis de transmisión de la bacteria por contacto con el reservorio, pero se pone en evidencia un potencial riesgo de transmisión de serovariedades patógenas a través de las mascotas que permanecen en constante contacto con los humanos.

Para el caso de los cerdos, observamos que la diversidad de especies encontrada es un poco más amplia ya que además de encontrar muestras que presentaron el genotipo 2 (perfil 1-2-1), también cuatro de ellas pertenecían a la especie *L. santarosai*, y dos a las especies *L. kirschneri* y *L. noguchii*. Éstas últimas tres especies no han sido reportadas en cerdos hasta la fecha. Por otro lado, la prevalencia de las especies *L. santarosai* y *L. noguchii* es escasa en humanos, por lo que podrían ser serovariedades con predisposición a un determinado hospedero (Petrakovsky M *et al.*, 2013).

Cinco de las muestras (EC165, EC186, EC216, EC201 y EP206) que fueron agrupadas en dos nuevos *clusters* (10 y 12), no observados en las cepas de referencia, presentaron la misma secuencia al compararlas con las cepas pertenecientes a la especie *L. santarosai* y *L. noguchii* utilizadas en este estudio, aunque mostraron un perfil de *melting* distinto. Ello podría deberse a la baja concentración de ADN en dichas muestras ($<1 \times 10^0$ copias/ μ L), coincidiendo con lo observado en el ensayo de sensibilidad donde las muestras de orina inoculadas con la bacteria a una dilución de 1×10^0 bacterias/mL cambiaban su perfil de *melting*.

VIII.6. Importancia epidemiológica del estudio.

El éxito del control y prevención de Leptospirosis depende en gran medida del conocimiento de las fuentes de infección y el diagnóstico oportuno de la enfermedad, ya que la inmunidad hacia *Leptospira* se caracteriza por ser específica a una determinada serovariedad. Por esta razón, es necesario identificarlas correctamente en muestras de orina en las regiones de mayor incidencia de la enfermedad.

En el país, los únicos estudios epidemiológicos de leptospirosis en reservorios se han basado en pruebas serológicas, como MAT, para la tipificación de serovariedades de *Leptospira* spp., sin embargo, esta técnica no puede diferenciar entre una infección reciente o pasada, además, su interpretación es complicada debido a la gran cantidad de reacciones cruzadas que existe entre serogrupos (Rak, 1983) y la toma de muestra continua es necesaria para confirmar una infección aguda. Además, a pesar de que MAT es considerada la prueba de oro para la identificación de *Leptospira*, ha demostrado un bajo poder de resolución, ya que

sólo es preciso en un 33% de los casos (Smythe *et al.*, 2009). Por otro lado, es un método laborioso ya que requiere de un panel de cultivos de cepas de referencia como antígenos y se necesita una cantidad excesiva de material de laboratorio ya que por cada muestra se utilizan alrededor de 3 placas de ELISA (la aglutinación sucede en cada pocillo frente a diferentes diluciones de cada cepa de referencia) y un gran número de láminas para realizar la lectura en el microscopio de campo oscuro. (Musso y La Scola, 2013). Por lo tanto, este estudio remarca la importancia de implementar técnicas moleculares confiables para la tipificación de *Leptospira* spp. que sean rápidas, sensibles y específicas, y para ello, la selección y optimización de los marcadores a utilizar es un punto crítico en ese estudio. Estos marcadores han mostrado ser promisorios y a pesar de no haber alcanzado una gran eficiencia de tipificación, esto puede mejorarse a futuro degenerando la secuencia de cebadores con el fin de que tengan una cobertura más amplia de la mayoría de serovariedades de *Leptospira* spp. cuya secuencia esté disponible. Además, se describe por primera vez un sistema basado en técnicas moleculares, capaz de identificar directamente, sin la necesidad de un cultivo previo, serovariedades de la bacteria en muestras de orina, y con el futuro potencial de ser utilizado en mejorar la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró *Leptospira* patógena en el 22% muestras de orina de perros y el 15% de muestras de orina de cerdos del distrito de Belén zona 20, que significa la presencia de animales de crianza con una infección actual crónica o aguda.
- ✓ El sistema HRM sólo identificó el 84% de las 19 cepas de referencia patógenas de *Leptospira* hasta nivel de serovariedad con un poder discriminatorio mayor al 90%.
- ✓ El sistema de genotipificación HRM de serovariedades de *Leptospira* spp. realizado directamente en muestras de orina de perros y cerdos, utilizando marcadores genéticos asociados a la antigenicidad de la bacteria, no es completamente concluyente, debido a la baja representatividad del número de cepas de referencia analizadas, su baja eficiencia de tipificación en muestras (50%) y la presencia de mutaciones silenciosas que participan en el cambio del perfil del *melting*.
- ✓ El 50% de las serovariedades identificadas en muestras de orina de perros pertenecían el genotipo 2 representado por las serovariedades *L. interrogans Australis Australis Ballico*, *L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami*, *L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman* y *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20*.
- ✓ El sistema HRM permitió identificar, con el apoyo del secuenciamiento, tres especies de *Leptospira* antes no reportadas en cerdos: *L. kirschnerii*, *L. santarosai* y *L. noguchii*.

X. LIMITACIONES

- ✓ La toma de muestra de orina de los perros fue la mayor limitación del estudio, ya que estuvo sujeta a una serie de dificultades como la deshidratación a la que están expuesto los perros debido a las altas temperaturas, en el caso de las hembras la cistocentesis sólo fue exitosa cuando la vejiga era prominente, que estaba sujeto a la cantidad de orina en ella, el transporte también fue un obstáculo ya que se perdió tiempo durante el desplazamiento en bote.
- ✓ La naturaleza de la muestra, también fue una limitación ya que para aumentar la pureza del ADN extraído, la orina se tuvo que someter a una tratamientos adicionales que facilitaron la pérdida de la carga bacteriana.
- ✓ El número de cepas de referencias disponibles (21) fue insuficiente para realizar un análisis significativo, ya que no abarca todas las serovariedades patógenas de *Leptospira*. Aun así, se trabajó con las cepas con mayor prevalencia en la región Loreto y que a su vez son utilizadas en el laboratorio de referencia para el diagnóstico de *Leptospira* del Instituto Nacional de Salud.
- ✓ Finalmente, el alto grado de dificultad de la obtención de las muestras no permitió conseguir el número muestral deseado para obtener una valor de prevalencia de las serovariedades identificadas en la orina de ambos reservorios y para validar el sistema propuesto.

XI. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ El objetivo en el futuro es validar el sistema comparándolo con una prueba de oro y con un mayor número de cepas de referencia.
- ✓ Se podría implementar nuevos marcadores en función a la data de serovariedades circundantes en los distintos focos epidemiológicos del país.
- ✓ La construcción del comportamiento epidemiológico de la enfermedad gracias a la identificación de las serovariedades presentes en animales reservorios u otras fuentes de contaminación, permitirá deducir los patrones epidemiológicos de infección y contribuir con el desarrollo de medidas de control y prevención más eficientes.
- ✓ Se podrán identificar las serovariedades con mayor prevalencia en la región amazónica y fortalecer el desarrollo de nuevas vacunas para prevenir casos de Leptospirosis tanto animal como humana.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdulla, P. K., Karstad, L., & Fish, N. A. (1962). Cultural and Serological Evidence of Leptospirosis in Deer in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 3(3), 71-78.
2. Acha, P. N., Szyfres, B., & Acha, P. N. (2003). *Bacterioses and mycoses* (3. ed., 2. print). Washington, D.C: Pan American Health Organization.
3. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296.
4. Agampodi, S. B., Moreno, A. C., Vinetz, J. M., & Matthias, M. A. (2013). Utility and Limitations of Direct Multi-Locus Sequence Typing on qPCR-Positive Blood to Determine Infecting Leptospira Strain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 184-185.
5. Ahmed, N., Devi, S. M., Valverde, M. de los A., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006a). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5, 28.
6. Ahmed, N., Devi, S. M., Valverde, M. de los A., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006b). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5, 28.

7. Alarcón-Villaverde, J. O., Romani-Romani, F., Tejada, R. A., Wong-Chero, P., & Céspedes-Zambrano, M. (2014). [Leptospirosis seroprevalence and associated features in rice farmers of tropical region of Peru]. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica*, 31(2), 195-203.
8. Anampa V, L., Rivera G, H., Falcón P, N., Arainga R, M., & Ramírez V, M. (2012). Frecuencia de leptospira spp en porcinos de crianza tecnificada y de traspatio beneficiados en dos mataderos de lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 240-245.
9. Balamurugan, V., Gangadhar, N. L., Mohandoss, N., Thirumalesh, S. R. A., Dhar, M., Shome, R., Rahman, H. (2013). Characterization of leptospira isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *SpringerPlus*, 2.
10. Becerra, M., & Patricia, A. (2004). Presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en sajinos (*Tayassu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la Amazonía peruana. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>
11. Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A. Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious Diseases*, 3(12), 757-771.
12. Blanco, R. M., & Romero, E. C. (2012). Efficacy of serum samples stored on filter paper for the detection of antibody to *Leptospira* spp. by

- microagglutination test (MAT). *Journal of Immunological Methods*, 386(1-2), 31-33.
13. Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M. S., Holden, M. T. G. Peacock, S. J. (2013). A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1954.
14. Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., & Weyant, R. S. (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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 2, 839-858.
15. Bulach, D. M., Kalambaheti, T., de la Peña-Moctezuma, A., & Adler, B. (2000). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 375-380.
16. Bulach, Dieter M., Zuerner, R. L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P. A. Adler, B. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14560-14565.
17. Caimi, K., Repetto, S. A., Varni, V., & Ruybal, P. (2017). *Leptospira* species molecular epidemiology in the genomic era. *Infection, Genetics*

and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 54, 478-485.

18. Céspedes, M., Balda, L., González, D., & Tapia, R. (2006). Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 23(1), 56–66.
19. Céspedes, M., Chu, M., Cano, E., Huaranca, I., Atoche, H., Ortiz, H., Huamán, T. (2007). Prevalence of antibodies against *Leptospira* in asymptomatic persons and dogs in Chancay, Lima 2001. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24(4), 343-349.
20. Céspedes, M., Fernández, R., Rimarachín, R., Taipe, H., Cenepo, J., Mori y Gonzales, M. Tapia, R. (2004). Leptospirosis: Una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 21(2), 62–70.
21. Céspedes, M., Ormaeche, M., Condori, P., Balda, L., & Glenney, M. (2003). Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(4), 80–185.
22. Cruz, L. S., Vargas, R., & Lopes, A. A. (2009). Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethnicity & Disease*, 19(1 Suppl 1), S1-37-41.

23. de Hidalgo, J. L., Hidalgo, R., & Flores, M. (1981). Leptospirosis entingo maria, departamento de huanuco, peru. 1. estudio en el hombre y animales domesticos.
24. Evangelista, K. V., & Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, 5(9), 1413-1425.
25. Faine, S. (1962). Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. *The Journal of Hygiene*, 60(4), 427-434.
26. Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D. E. Galloway, R. L. (2016). What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004403.
27. Galloway, R. L., & Levett, P. N. (2008). Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(4), 628-632.
28. Galloway, R. L., & Levett, P. N. (2010). Application and Validation of PFGE for Serovar Identification of *Leptospira* Clinical Isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9), e824.
29. Gamberini, M., GÃ³mez, R. M., Atzingen, M. V., Martins, E. A. L., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C., Nascimento, A. L. T. O. (2005). Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential

- vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 305-313.
30. Gentilini, F., Zanoni, R. G., Zambon, E., & Turba, M. E. (2015). A comparison of two real-time polymerase chain reaction assays using hybridization probes targeting either 16S ribosomal RNA or a subsurface lipoprotein gene for detecting leptospires in canine urine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 696-703.
 31. Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., & Wittwer, C. T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry*, 49(3), 396-406.
 32. Haake, D. A., Suchard, M. A., 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. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2818-2828.
 33. Hauk, P., Macedo, F., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., de Moraes, Z. M., Barbosa, A. S., & Ho, P. L. (2008). In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. *Infection and Immunity*, 76(6), 2642-2650.
 34. Hookey, J. V. (1990). The detection of genetic variation in *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae by ribosomal RNA gene restriction fragment patterns. *FEMS Microbiology Letters*, 60(3), 329-335.

35. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. (2003). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(5), 292-292.
36. Johnson, M. A. S., Smith, H., Joseph, P., Gilman, R. H., Bautista, C. T., Campos, K. J. Vinetz, J. M. (2004). Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1016-1022.
37. Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). Leptospira: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(10), 736-747.
38. Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences*: 10(2), 189-191.
39. Lambris, J. D., Ricklin, D., & Geisbrecht, B. V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(2), 132-142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1824>
40. Lehmann, J., Matthias, M., Vinetz, J., & Fouts, D. (2014). Leptospiral Pathogenomics. *Pathogens*, 3(2), 280-308.
41. Leptospira MLST Home Page. (s. f.). Recuperado 30 de abril de 2018, de <https://pubmlst.org/leptospira/>
42. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326.

43. Llewellyn, J.-R., Krupka-Dyachenko, I., Rettinger, A. L., Dyachenko, V., Stamm, I., Kopp, P. A Hartmann, K. (2016). Urinary shedding of leptospire and presence of *Leptospira* antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 129(5-6), 251-257.
44. Lyons, D. M., & Luring, A. S. (2017). Evidence for the Selective Basis of Transition-to-Transversion Substitution Bias in Two RNA Viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3205-3215.
45. 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*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 539-545.
46. McBride, A. J. A., Athanazio, D. A., Reis, M. G., & Ko, A. I. (2005). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(5), 376-386.
47. Miraglia, F., de Moraes, Z. M., Melville, P. A., Dias, R. A., & Vasconcellos, S. A. (2009). EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 189-193.
48. Mohammed, H., Nozha, C., Hakim, K., & Abdelaziz, F. (2011). LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 02(06).

49. Mulla, S., Chakraborty, T., Patel, M., Pandya, H. P., Dadhaniya, V., & Vaghela, G. (2006). Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 49(3), 468-470.
50. Musso, D., & La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 46(4), 245-252.
51. Nahori, M.-A., Fournié-Amazouz, E., Que-Gewirth, N. S., Balloy, V., Chignard, M., Raetz, C. R. H. Werts, C. (2005). Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(9), 6022-6031.
52. Naze, F., Desvars, A., Picardeau, M., Bourhy, P., & Michault, A. (2015a). Use of a New High Resolution Melting Method for Genotyping Pathogenic *Leptospira* spp. *PLOS ONE*, 10(7), e0127430.
53. Naze, F., Desvars, A., Picardeau, M., Bourhy, P., & Michault, A. (2015b). Use of a New High Resolution Melting Method for Genotyping Pathogenic *Leptospira* spp. *PLOS ONE*, 10(7), e0127430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127430>
54. Noguchi, H. (1918). Morphological characteristics and nomenclature of leptospira (spirochaeta) icterohaemorrhagiae (INADA AND IDO). *The Journal of Experimental Medicine*, 27(5), 575-592.

55. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almagbrazi, H. G., ... Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W163-W169.
56. Palmer, M. F., Waitkins, S. A., & Wanyangu, S. W. (1987). A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 265(1-2), 151-159.
57. Petrakovsky M, J., Tinao, J., & M, J. E. (2013). Leptospirosis porcina: prevalencia serológica en establecimientos productores de la República Argentina. *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3282-3287.
58. Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
59. Picardeau, Mathieu. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307.
60. Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature reviews. Genetics*, 12(1), 32-42. <https://doi.org/10.1038/nrg2899>
61. Radaelli, E., Del Piero, F., Aresu, L., Sciarrone, F., Vicari, N., Mattiello, S. Scanziani, E. (2009). Expression of major histocompatibility complex

- class II antigens in porcine leptospiral nephritis. *Veterinary Pathology*, 46(5), 800-809.
62. Rahman, S. M. M., Song, H. B., Jin, Y., Oh, J.-K., Lim, M. K., Hong, S.-T., & Choi, M.-H. (2017). Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting *cox1* gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), e0005995.
63. Rak, J. (1983). [Problems of standardizing the density of antigens for the *Leptospira* microagglutination test]. *Ceskoslovenska Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 32(2), 63-67.
64. Samir, A., Soliman, R., El-Hariri, M., Abdel-Moein, K., & Hatem, M. E. (2015). Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(3), 272-277.
65. Sharp, T. M., Rivera García, B., Pérez-Padilla, J., Galloway, R. L., Guerra, M., Ryff, K. R. Bower, W. A. (2016). Early Indicators of Fatal Leptospirosis during the 2010 Epidemic in Puerto Rico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004482.
66. Singh, V. K., Mangalam, A. K., Dwivedi, S., & Naik, S. (1998). Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *BioTechniques*, 24(2), 318-319.
67. Smythe, L. D., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S., Dohnt, M. F. Peacock, S. J. (2009). The microscopic

- agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 695-697.
68. Stallman, N. D. (1984). International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2), 258–259.
 69. Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(3), 247-255.
 70. Taylor, K. A., Barbour, A. G., & Thomas, D. D. (1991). Pulsed-field gel electrophoretic analysis of leptospiral DNA. *Infection and Immunity*, 59(1), 323-329.
 71. Ullmann, L. S., & Langoni, H. (2011). Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(2), 119-129.
 72. Vedhagiri, K., Natarajaseenivasan, K., Chellapandi, P., Prabhakaran, S. G., Selvin, J., Sharma, S., & Vijayachari, P. (2009). Evolutionary Implication of Outer Membrane Lipoprotein-Encoding Genes ompL1, lipL32 and lipL41 of Pathogenic *Leptospira* Species. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(3), 96-106.

73. Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6 Pt 1), 853-860.
74. Xu, Y., Zhu, Y., Wang, Y., Chang, Y.-F., Zhang, Y., Jiang, X., Wang, J. (2016). Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Scientific Reports*, 6, 20020. <https://doi.org/10.1038/srep20020>
75. Yang, C.-W., Wu, M.-S., Pan, M.-J., Hsieh, W.-J., Vandewalle, A., & Huang, C.-C. (2002). The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(8), 2037-2045.
76. Zuerner, R. L., Ellis, W. A., Bolin, C. A., & Montgomery, J. M. (1993). Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), 578-583.

XIII. ANEXO

ANEXO 1

FICHA DE MUESTREO N° _____

Responsable: ANIKA GUADALUPE ECA AVILA

Fecha: ____/____/____

Hora _____

A. INFORMACIÓN BÁSICA DE LA LOCALIDAD

Departamento: Iquitos

Distrito: Belén

Sector: _____

Código: _____

Dirección: _____

Persona Entrevistada (jefe del hogar): Padre ()

Madre ()

otro _____

B. INFORMACIÓN SOBRE LOS ANIMALES QUE VIVEN EN EL DOMICILIO

1.- Tipo y Número: Perro () _____ Gato () _____

Cerdo () _____ Otro _____

2.- Antigüedad del animal: Perro _____ Cerdo _____

4.- Sexo del animal: Perro _____ Cerdo _____

5.- Promedio de horas que el animal pasa fuera del domicilio: _____

6.- Presencia de desnutrición si () No ()

7.- Sarna si () No ()

C. INFORMACIÓN SOBRE LA FAMILIA

8.- ¿Cuántas personas habitan en _____
la vivienda?

9.- ¿Cuántos miembros tiene su _____
familia?

10. Material de construcción: Alto() Medio() Bajo()

15.- ¿Ha presentado síntomas
febriles Si () No ()

D. DATOS DEL ANIMAL:

Código del animal	Edad	Nombre	Observaciones
AEA001			

ANEXO 3.

Porcentajes de confianza y perfiles de *melting* de cepas de referencia de *Leptospira* spp. obtenido con los marcadores del estudio usando el análisis HRM.

Tabla 1A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *lpxC*.

Sample	Cluster	Percent Confidence	Sample	Cluster	Percent Confidence
L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava	Cluster 1	96.7	L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	Cluster 2	91.1
	Cluster 1	97.4		Cluster 2	94.6
	Cluster 1	98		Cluster 2	98.9
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	Cluster 1	95.5	L. interrogans Australis Australis Ballico	Cluster 2	94
	Cluster 1	97.3		Cluster 2	97.7
	Cluster 1	97.8		Cluster 2	97.8
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	Cluster 1	97.7	L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami	Cluster 2	98.4
	Cluster 1	98.2		Cluster 2	97.7
	Cluster 1	98.6		Cluster 2	97.4
L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	Cluster 1	99	L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan	Cluster 2	98.2
	Cluster 1	98.3		Cluster 2	98.7
	Cluster 1	97.6		Cluster 2	98.2
L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem	Cluster 1	99.2	L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman	Cluster 3	99.5
	Cluster 1	99.2		Cluster 3	99.4
	Cluster 1	98.6		Cluster 3	99.8
L. santarosai Mini Georgia Lt 117	Cluster 1	99	L. noguchii Panama Panama CZ214K	Cluster 4	98
	Cluster 1	98.8		Cluster 4	98.1
	Cluster 1	98.5		Cluster 4	97.4
L. borgpetersenii Trassovi Tarassovi Perepelitsin	Cluster 1	90.6	L. kirschneri Grippatyphosa Grippatyphosa Moskava V	Cluster 5	98.7
	Cluster 1	98.2		Cluster 5	99.8
	Cluster 1	98.5		Cluster 5	99.4
L. interrogans Sejroe Wolfii 3705	Cluster 1	98.5	L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht	Cluster 1	N/A
	Cluster 1	98.2		Cluster 1	N/A
	Cluster 1	99.3		Cluster 1	N/A
L. borgpetersenii Ballum Mus 127	Cluster 1	98.3			
	Cluster 1	97.2			

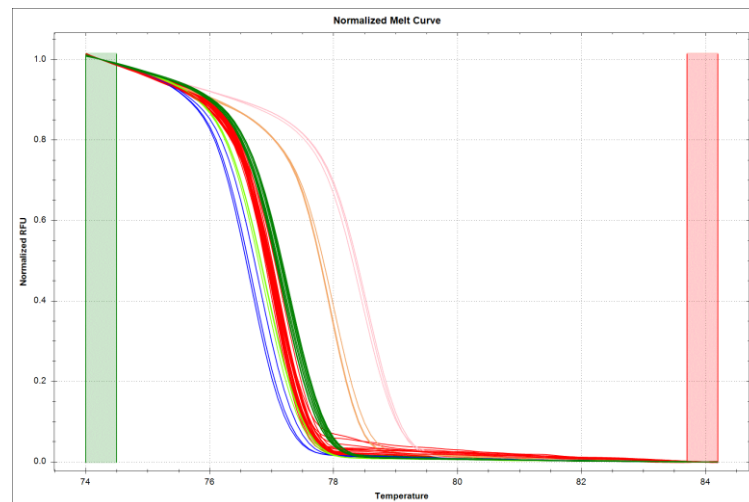


Figura 1A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *lpxC*.

Tabla 2A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *secY-1*.

Sample	Cluster	Percent Confidence	Sample	Cluster	Percent Confidence
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	Cluster 1	97.4	L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	Cluster 3	96.8
	Cluster 1	98.4		Cluster 3	96.9
	Cluster 1	98.3		Cluster 3	86.9
	Cluster 1	99.5		Cluster 3	98.7
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	Cluster 1	99.9	L. interrogans Sejroe Wolfii 3705	Cluster 3	99.3
	Cluster 1	97.9		Cluster 3	99.4
	Cluster 1	98.9		Cluster 4	97.4
	Cluster 1	98.8		Cluster 4	99.6
L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	Cluster 1	99.1	L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman	Cluster 4	99.6
	Cluster 1	97.9		Cluster 5	95.8
	Cluster 1	99.9		Cluster 5	95.2
	Cluster 1	99.9		Cluster 5	91.9
L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem	Cluster 2	96.1	L. borgpetersenii Ballum Mus 127	Cluster 6	99.7
	Cluster 2	93.4		Cluster 6	99.9
	Cluster 2	90.5		Cluster 6	99.8
	Cluster 2	92.2		Cluster 7	99.3
L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan	Cluster 2	87.6	L. santarosai Mini Georgia Lt 117	Cluster 7	99.7
	Cluster 2	91.6		Cluster 7	98.7
	Cluster 2	93.9		Cluster 8	97
	Cluster 2	95.9		Cluster 8	97.7
L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht	Cluster 2	95.3	L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava	Cluster 8	97

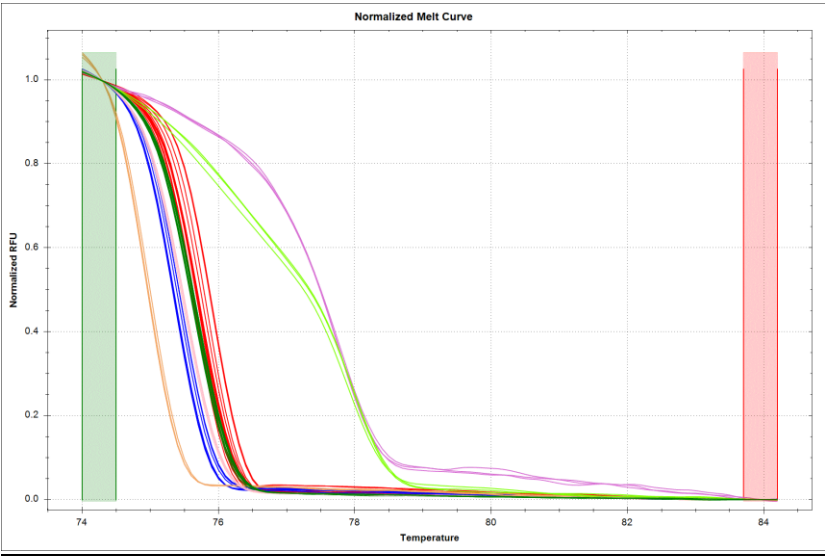


Figura 2A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *secY-1*.

Tabla 3A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *secY-2*.

Sample	Cluster	Percent Confidence	Sample	Cluster	Percent Confidence
L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava	Cluster 1	98.6	L. Interrogans Djasiman Djasiman Djasiman	Cluster 2	98.7
	Cluster 1	98.1		Cluster 2	98.6
	Cluster 1	98.1		Cluster 2	99
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	Cluster 1	99.4	L. noguchii Panama Panama CZ214K	Cluster 3	97.9
	Cluster 1	98.9		Cluster 3	98
	Cluster 1	99.4		Cluster 3	98.5
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	Cluster 1	99.8	L. kirschneri Grippatypophosa Grippatypophosa Moskava V	Cluster 4	98.9
	Cluster 1	99.8		Cluster 4	99.1
	Cluster 1	100		Cluster 4	99.2
L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	Cluster 1	99.8	L. interrogans Sejroe Wolfii 3705	Cluster 5	99.6
	Cluster 1	98.7		Cluster 5	99.4
	Cluster 1	98.3	L. santarosai Mini Georgia Lt 117	Cluster 6	99.2
L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem	Cluster 1	99.8		Cluster 6	99.3
	Cluster 1	99.7			
	Cluster 1	99.5			
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	Cluster 1	98.3			
	Cluster 1	98.6			
	Cluster 1	99.5			
L. interrogans Australis Australis Ballico	Cluster 1	99.6			
	Cluster 1	99.1			
	Cluster 1	98.4			
L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami	Cluster 1	97.8			
	Cluster 1	97.8			
	Cluster 1	99.7			
L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan	Cluster 1	99.6			
	Cluster 1	99.6			
	Cluster 1	99			
L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht	Cluster 1	98.8			
	Cluster 1	98.7			
	Cluster 1	98.7			

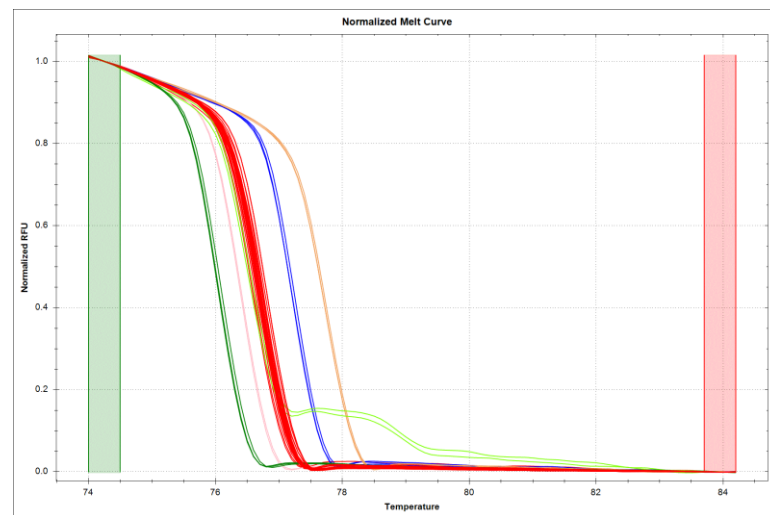


Figura 2A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *secY-2*.

Tabla 4A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *ompL1*.

Sample	Cluster	Percent Confidence	Sample	Cluster	Percent Confidence
L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht	Cluster 1	98.2	L. interrogans Australis Australis Ballico	Cluster 2	94
	Cluster 1	98.8		Cluster 2	97.7
	Cluster 1	99.1		Cluster 2	83.1
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	Cluster 1	99.4	L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan	Cluster 2	99.7
	Cluster 1	98.9		Cluster 2	99.2
	Cluster 1	99.6		Cluster 2	99.4
L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	Cluster 1	98.1	L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava	Cluster 2	99.3
	Cluster 1	99.3		Cluster 2	99.3
	Cluster 1	99.7		Cluster 2	98.1
L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem	Cluster 1	98.5	L. interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20	Cluster 2	98.8
	Cluster 1	97.7		Cluster 2	98.5
	Cluster 1	98.3		Cluster 2	97.4
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	Cluster 1	99.2	L. noguchii Panama Panama CZ214K	Cluster 3	99.2
	Cluster 1	98.7		Cluster 3	98.6
	Cluster 1	99.1		Cluster 3	99
L. interrogans Sejroe Wolfii 3705	Cluster 1	98.2			
	Cluster 1	96.9			
	Cluster 1	97.9			
L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami	Cluster 1	96.3			
	Cluster 1	96.2			
	Cluster 1	93.2			

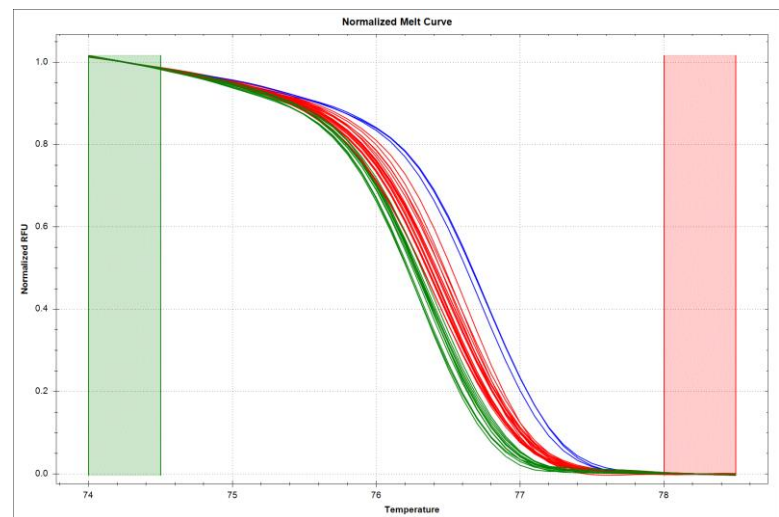


Figura 4A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *ompL1*.

Tabla 5A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *wzy*.

Sample	Cluster	Percent Confidence	Sample	Cluster	Percent Confidence
L. interrogans Canicola Canicola Hond Utrecht	Cluster 1	99.8	L. interrogans Australis Australis Ballico	Cluster 2	96.2
	Cluster 1	99.6		Cluster 2	98.1
	Cluster 1	96.7		Cluster 2	98.1
L. interrogans Icterohaemorrhagiae Mankarso Mankarso	Cluster 1	99.4	L. interrogans Bataviae Bataviae Van Tienan	Cluster 2	88.7
	Cluster 1	97.8		Cluster 2	98.5
	Cluster 1	94.8		Cluster 2	98
L. interrogans Sejroe Hardjo Hrdjoprajino	Cluster 1	99.3	L. interrogans Australis Bratislava Jez Bratislava	Cluster 2	95.9
	Cluster 1	98.9		Cluster 2	98.7
	Cluster 1	98.1		Cluster 2	98.7
L. interrogans Pyrogenes Pyrogenes Salinem	Cluster 1	99.6	L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA	Cluster 3	97.8
	Cluster 1	99.8		Cluster 3	97.8
	Cluster 1	96.9		Cluster 3	84.9
L. interrogans Sejroe Wolfii 3705	Cluster 1	98.7	L. noguchii Panama Panama CZ214K	Cluster 4	98.6
	Cluster 1	85.9		Cluster 4	99.4
	Cluster 1	97.1		Cluster 4	99.5
L. interrogans Autumnalis Autumnalis Akiyami	Cluster 1	83.6	L. santarosai Mini Georgia Lt 117	Cluster 5	99.5
	Cluster 1	95.9		Cluster 5	99.5
	Cluster 1	94.3		Cluster 5	99.5

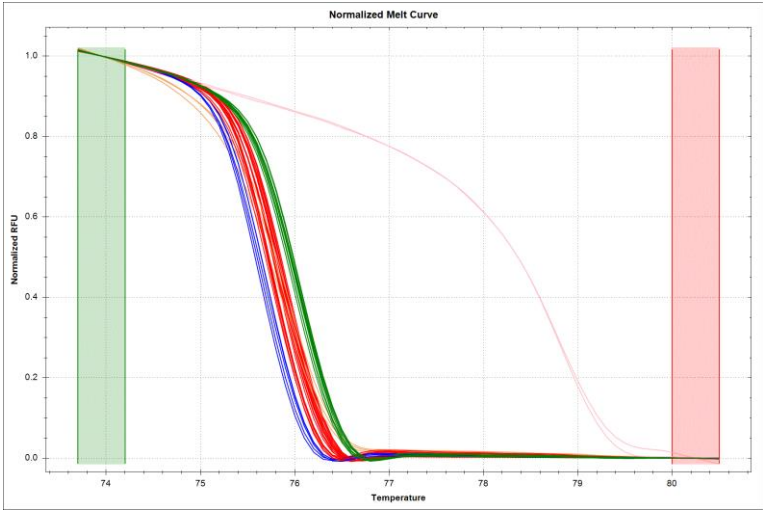


Figura 5A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *wzy*.

Tabla 6A. Porcentajes de confianza de los *clusters* obtenidos con el marcador *neuB*.

Sample	Cluster	Percent Confidence
L. santarosai Mini Georgia Lt 117	Cluster 1	98.4
	Cluster 1	98.8
	Cluster 1	99.1
L. borgpetersenii Ballum Mus 127	Cluster 2	99.4
	Cluster 2	98.1
	Cluster 2	99.2

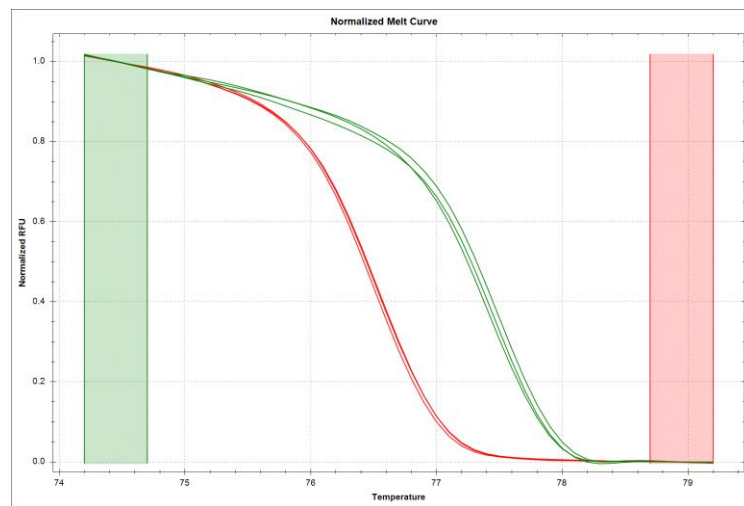


Figura 6A. Perfil de *melting* utilizando el marcador *neuB*.

ANEXO 4.

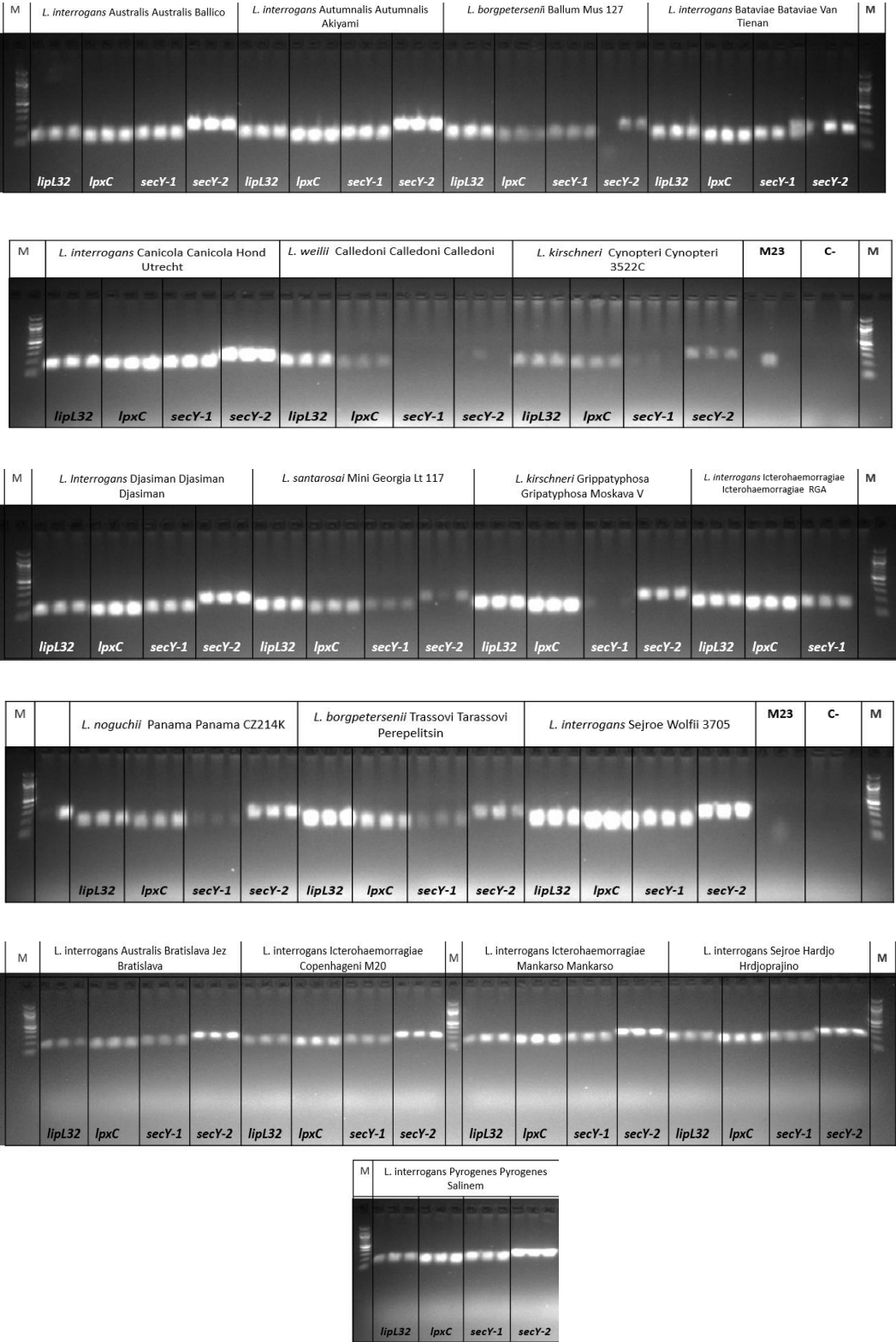


Figura 7A. Gel de electroforesis. Las bandas corresponden a los productos de PCR generados con los cebadores *lipL32*, *lpxC*, *secY-1* y *secY-2*.

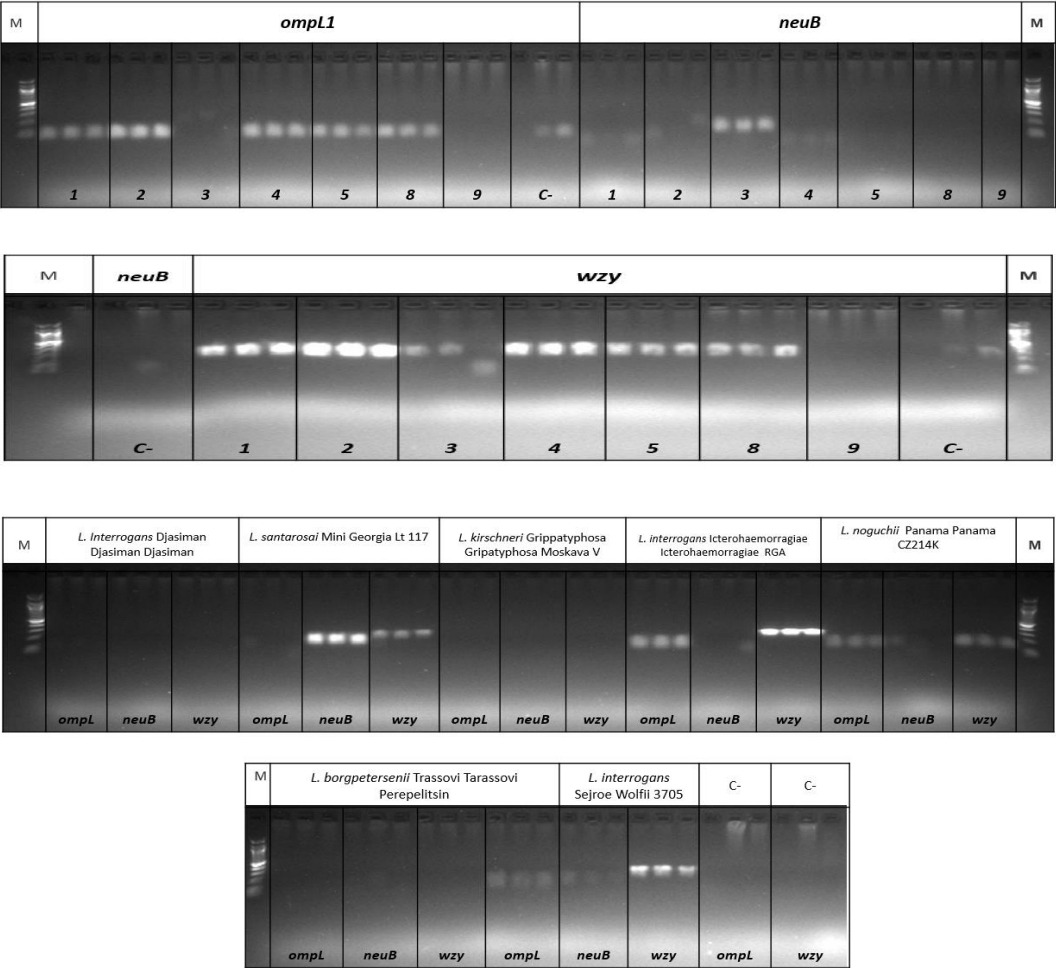


Figura 8A. Gel de electroforesis. Las bandas corresponden a los productos de PCR generados con los cebadores *ompL*, *neuB* y *wzy*.