



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE ESPECIES
PATÓGENAS DE *Leptospira* SPP. Y SUS
RESERVORIOS DOMÉSTICOS NO
ROEDORES, DENTRO DE UNA
LOCALIDAD URBANA DE LA
AMAZONIA PERUANA

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

GERARDO RAMÓN DÍAZ ORTIZ

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR

Joseph M. Vinetz

A las mujeres de mi vida;

en especial a la más reciente e importante, Jimena

Agradecimientos

No hubiese sido posible concretar este trabajo de investigación sin el apoyo incondicional de mi familia, la nueva y la de siempre, quienes tuvieron la difícil tarea de darme el soporte emocional necesario para afrontar estos dos años llenos de todo. Y, además comprendieron mi incomprensible decisión de prolongar mi estancia en las aulas universitarias por dos años más.

Quisiera agradecer también la decisiva influencia de mi mentor, el Dr. Joseph Vinetz, quien muy amablemente ayudo a hacer exitosa mi incursión en el vasto mundo de la biología molecular y la salud pública. Asimismo, agradecer el apoyo brindado por la Dra. Kathy Torres, directora del grupo de investigación de leptospirosis en UPCH, durante las distintas etapas del desarrollo de este trabajo de investigación.

Por otra parte, debo agradecer al enorme bastión psicológico que significaron las buenas personas que conocí a lo largo de esta intensa travesía y que, con las vicisitudes de la misma, demostraron ser muy buenos amigos. A Karencita por su paciencia, sus enseñanzas y su noble guía a través del mundo de las leptospiras. A Anika por las decisivas discusiones y esclarecimientos del mundo molecular, y por nunca negarme una oportuna y optimista respuesta. A Roman, Josmell, Danitza, Roberson y David, por su amistad y por ser parte de mi fórmula del éxito. A Gerald por su valiosa contribución con todo el análisis estadístico de este trabajo. A Noemi por facilitarme cepas, equipos y una buena conversación. A Silvia e Inti por su siempre entusiasta donación biológica para mis procesos de estandarización.

Asimismo, es oportuno agradecer a todo el personal del laboratorio Satélite de Iquitos, quienes siempre se mostraron dispuestos a ayudarme en las primeras y calurosas etapas de este trabajo en Belén. Agradecer también a todos los propietarios de los canes en Belén por su entusiasta colaboración y a estos últimos por su anónima contribución en el conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis en nuestra amazonia peruana.

Finalmente, no puedo olvidar agradecer a todas las personas que no me dejaron las cosas fáciles durante el curso de esta maestría, porque sin esos retos jamás hubiese podido demostrarme a mí mismo lo que en realidad era capaz de hacer.

Fuentes de financiamiento

Esta investigación y los estudios de postgrado del investigador fueron financiados a través de una beca integral otorgada por el proyecto “*Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia*”- FOGARTY. Grant number: 2D43TW007120-11A1.

Tabla de contenidos

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III.	MARCO TEÓRICO	6
	3.1. Leptospirosis	6
	3.2. <i>Leptospira</i> spp.	10
	3.3. Transmisión y mantenimiento de la leptospirosis	22
	3.4. Diagnóstico y tipificación de <i>Leptospira</i> spp.	24
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
V.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30
VI.	METODOLOGIA	32
	6.1. Diseño del estudio	32
	6.2. Población	35
	6.3. Muestra	37
	6.4. Procedimientos y técnicas	39
	6.5. Consideraciones éticas	56
	6.6. Plan de análisis	57
VII.	RESULTADOS	58
	7.1. Identificación de leptospiras patógenas mediante cultivo microbiológico	58
	7.2. Identificación y cuantificación de leptospiras patógenas mediante qPCR <i>LipL32</i>	58
	7.3. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de especie	64
	7.4. Estandarización del protocolo de PCR-HRM para la identificación de serovares patógenos de <i>Leptospira</i>	74
	7.5. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de serovar	81
	7.6. Análisis de asociación entre especie patógena de <i>Leptospira</i> y tipo de reservorio	83

VIII. DISCUSIÓN	85
8.1. Prevalencia y nivel de excreción de leptospiras patógenas en perros y cerdos de Belén	86
8.2. Especies de <i>Leptospira</i> excretada por los reservorios no roedores y su asociación al tipo de reservorio en Belén	91
8.3. El análisis de melting de alta resolución y su aplicación para la identificación de serovar de <i>Leptospira</i> independiente de cultivo	95
IX. CONCLUSIONES	103
X. RECOMENDACIONES	104
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	105

Lista de Tablas

Tabla 1. Numero de genomas completos secuenciados para el género <i>Leptospira</i> spp.	19
Tabla 2. Comparación de métodos convencionales para el diagnóstico de leptospirosis	28
Tabla 3. Relación de serovares de referencia utilizados en este estudio	40
Tabla 4. Condiciones de PCR en tiempo real <i>GAPDH</i>	44
Tabla 5. Condiciones de qPCR <i>LipI32</i>	45
Tabla 6. Condiciones de PCR <i>rrs</i>	47
Tabla 7. Condiciones de la PCR-HRM del gen <i>rfbX</i>	52
Tabla 8. Muestras de orina de perro positivas qPCR <i>LipI32</i>	61
Tabla 9. Muestras de orina de cerdo positivas a qPCR <i>LipI32</i>	62
Tabla 10. Muestras positivas a qPCR <i>LipI32</i> según tipo de reservorio	63
Tabla 11. Clasificación de 18 serovares referencia de <i>Leptospira</i> mediante PCR-HRM	76
Tabla 12. Sensibilidad analítica de los 3 cebadores de la PCR-HRM	78
Tabla 13. Clasificación de 4 muestras de perro positivas a qPCR <i>LipI32</i> mediante PCR-HRM	82
Tabla 14. Especies de <i>Leptospira</i> identificadas según tipo de reservorio	83

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Leptospira</i>	11
Figura 2. Pared celular de <i>Leptospira</i>	15
Figura 3. Clasificación de <i>Leptospira</i> de acuerdo a las especies del género	17
Figura 4. Distribución de genes de virulencia en las distintas especies de <i>Leptospira</i>	21
Figura 5. Ciclo de transmisión de la leptospirosis	24
Figura 6. Flujograma de la metodología del estudio	34
Figura 7. Localización de Belén (Mayinas, Loreto)	36
Figura 8. Canes en una vivienda de Belén	36
Figura 9. Posición de los cebadores de la qPCR <i>Lipl32</i>	46
Figura 10. Posición de los cebadores de la PCR <i>rrs</i> (16S)	48
Figura 11. Posición de los cebadores de la PCR-HRM <i>rfbX</i>	51
Figura 12. Control de calidad de las muestras de ADN de perro	59
Figura 13. Control de calidad de las muestras de ADN de cerdo	60
Figura 14. Diferencias entre el Log10 de nivel de leptospiuria de perro y cerdo	63
Figura 15. Sensibilidad analítica de primera ronda de PCR <i>rrs</i> (16S) en orina de Perro y Cerdo	65
Figura 16. Sensibilidad analítica de segunda ronda de PCR <i>rrs</i> (16S) en orina de Perro y Cerdo	66
Figura 17. Especificidad analítica de la PCR <i>rrs</i> (16S)	68
Figura 18. Resultados de PCR <i>rrs</i> de muestras de perro	

para la Primera ronda de PCR y Segunda ronda de PCR	70
Figura 19. Resultados de PCR <i>rrs</i> de muestras de cerdo para la Primera ronda de PCR y Segunda ronda de PCR	71
Figura 20. Árbol filogenético del marcador <i>rrs</i> con 16 muestras de perro, 10 de cerdo y secuencias referencia de <i>Leptospira</i>	73
Figura 21. Gráfico de la regresión negativa de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM	75
Figura 22. Gráfico de la Diferencial de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM	77
Figura 23. Gráfico de la Diferencial de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM para distintas diluciones de <i>Leptospira</i>	78
Figura 24. Gráfico de la regresión negativa de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM con los 3 pares de cebadores por separado	80
Figura 25. Diferencias entre el Log ₁₀ de nivel de excreción de las 3 especies de <i>Leptospira</i>	84

Lista de abreviaciones

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
bp	Pares de bases
Cq	Ciclo umbral (Cycle quantification)
E	Eficiencia de reacción
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HRM	High Resolution Melting
IC 95%	Intervalo de confianza 95%
IQR	Rango Intercuartil
Log ₁₀	Logaritmo en base 10
LPS	Lipopolisacárido
MAT	Micro Agglutination Test
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multi Locus VNTR Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real

R ²	Coefficiente de determinacion
rARN	Ácido Ribonucleico Ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
RFU	Relative Fluorescent Units
SPHS	Síndrome de Hemorragia Pulmonar Severa
SQ	Cantidad o concentración inicial (Starting quantity)
Sv	Serovar
tARN	Ácido Ribonucleico de Transporte
TLR	Toll Like Receptor
Tm	Temperatura de Melting

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana endémica en el Perú, cuyo complicado diagnóstico y epidemiología es aún poco explorada. El presente trabajo evalúa la hipótesis de la asociación entre al menos un serovar o especie patógena de *Leptospira* y su reservorio doméstico, perro o cerdo, perteneciente a los sectores 20 y 21 de Belén, Iquitos. Para lo cual se colectaron 127 muestras de orina de perro, 123 de cerdo y 161 riñones de cerdo en los sectores mencionados. Mediante qPCR *lipL32*, se reportó una prevalencia de leptospirosis de 15% en perros y 9.8% en cerdos, con concentración de ADN de *Leptospira* promedio de 4.49×10^2 y 0.29×10^1 copias de genoma/reacción para perros y cerdos respectivamente. Mediante secuenciación del gen *rrs* (16S) se identificaron las especies *L. interrogans*, *L. noguchii* y *L. santarosai* en orina de perros, y *L. interrogans* y *L. santarosai* en orina de cerdos. Se encontró asociación entre al menos una especie de *Leptospira* y el tipo de reservorio. Además, se estandarizó una técnica de análisis de *melting* de alta resolución del gen *rfbX* para la identificación de serovar, la cual se utilizó para reportar por primera vez a *L. interrogans* serovar Bataviae en orina de perro en Belén.

Palabras clave: *Leptospira*, Reservorio, Perro, Cerdo, Amazonia

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial zoonosis endemic in Peru, whose complicated diagnosis and epidemiology remains unexplored. The present work tests the hypothesis of the association between at least one pathogenic *Leptospira* serovar or specie and its domestic reservoir, dog or pig, belonging to sectors 20 and 21 of Belén, Iquitos. For which, 127 dog urine, 123 pig urine samples and 161 pig kidneys were collected in these sectors. Using a qPCR of *lipL32* gene, a prevalence of leptospiuria of 15% in dogs and 9.8% in pigs was reported, with an average *Leptospira* DNA concentration of 4.49×10^2 and 0.29×10^1 genome copies/reaction for dogs and pigs respectively. According to the *rrs* (16S) sequencing, *L. interrogans*, *L. noguchii* and *L. santarosai* species were identified in dog urine, and *L. interrogans* and *L. santarosai* in pig urine. Association was found between at least one species of *Leptospira* and the type of reservoir. In addition, a technique based on high-resolution melting analysis of the *rfbX* gene was standardized for serovar identification, which was used to report for the first time *L. interrogans* serovar Bataviae in dog urine from Belen.

Keywords: *Leptospira*, Reservoir, Dog, Pig, Amazon

I. INTRODUCCION

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana causada por serovares patógenos del género *Leptospira* spp. Anualmente se reportan más de 1 millón de casos de leptospirosis alrededor del mundo, de los cuales, casi 60 000 son fatales, lo que la convierte, en términos de morbilidad y mortalidad, en una zoonosis tan importante como la rabia, la equinococosis y la cisticercosis (1).

Los signos clínicos varían desde un síndrome febril autolimitante hasta el cuadro conocido como enfermedad de Weil, caracterizado por ictericia, daño renal, vascular y síndrome hemorrágico pulmonar. Muchas veces los signos clínicos iniciales son confundidos con los de otras enfermedades infecciosas tropicales como la influenza, malaria o dengue, lo que provoca una subestimación de su impacto real en el mundo (2).

La enfermedad es endémica en regiones tropicales, principalmente en países en vías en desarrollo, donde las condiciones geográficas, el entorno socioeconómico y la abundancia de reservorios naturales favorecen el mantenimiento de la enfermedad. Tal es el caso de la amazonia peruana, principalmente las regiones de Madre de Dios y Loreto (3), donde la leptospirosis tiene una seroprevalencia que varía de 28% a 64.4% de acuerdo a la región (4,5). Asimismo, en la actualidad, recientes eventos climatológicos extremos ocurridos en el “Fenómeno del niño Costero 2017” han causado la reemergencia de la enfermedad en el norte del país (6). A pesar de todo este riesgo potencial para la

salud pública, la leptospirosis es una enfermedad aun desatendida y poco estudiada en nuestro país (7).

Dentro del ciclo de transmisión participan el hombre, los animales y el medio ambiente. Los reservorios animales portan la bacteria de manera crónica en sus túbulos renales y la excretan al medio ambiente de donde el hombre la adquiere al exponer mucosas o microabrasiones en la piel (8). Hasta el momento se han identificado cientos de mamíferos terrestres y marinos, aves y reptiles como reservorios de *Leptospira*, siendo los roedores clásicamente considerados los principales reservorios (2). Sin embargo, recientes estudios sugieren una importante participación de mamíferos domésticos, como el perro, el cerdo y vaca, en la transmisión de leptospirosis en países como la India y Ecuador (9,10). No obstante, esta relación aún no ha sido estudiada en nuestro país.

El agente etiológico de la leptospirosis, *Leptospira* spp., es una espiroqueta tipo gram negativo de lento y tedioso aislamiento con incubaciones prolongadas de hasta 16 semanas a 29°C. A pesar de tener una actual clasificación genética en 23 especies, aun se utiliza la clasificación serológica basada en la heterogeneidad del antígeno O de su lipopolisacárido (LPS), clasificándose en más de 300 serovares (2). La importancia de esta clasificación radica en la epidemiología, dada la relación específica serovar-hospedero y su distribución delimitada geográficamente.

Dentro de los métodos de diagnóstico están los convencionales métodos directos como el cultivo, y los indirectos como el Test de Aglutinacion Microscopica (MAT por sus siglas en ingles) y el ELISA. Todos estos métodos presentan serias limitaciones respecto a su metodología, utilidad, sensibilidad, y especificidad, lo que ocasiona una subestimación mayor aun de los casos de

leptospirosis principalmente en países tropicales sin un sistema de vigilancia (11). Para contrarrestar estas deficiencias, se han desarrollado métodos de diagnóstico directo basados en la detección y tipificación de ADN del patógeno mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes. Las técnicas principales incluyen la secuenciación del gen *rrs* (16S) y el gen *secY*, el Análisis Multilocus de Repeticiones en Tandem de Numero Variable (MLVA por sus siglas en ingles), la Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST por sus siglas en ingles) y el análisis de *Melting* de alta resolución (HRM por sus siglas en inglés) (12). Esta última ha emergido recientemente como una técnica práctica, confiable y con buen poder discriminatorio a nivel de serovar (13).

Este trabajo de investigación pretende explorar la relación que existe entre las leptospiras patógenas y los reservorios domésticos no convencionales, perro y cerdo, en la amazonia peruana. A través no solo de técnicas convencionales como el aislamiento microbiológico, sino también de novedosas técnicas independientes de cultivo basadas en la PCR en tiempo real, la secuenciación y el HRM. Con el objetivo de reconsiderar el rol que puedan cumplir los reservorios domésticos no roedores en el mantenimiento y transmisión de la leptospirosis en la amazonia peruana.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leptospirosis es la zoonosis bacteriana más extendida a nivel mundial, cuyo principal reservorio animal son los roedores. Es endémica en la amazonia peruana y últimamente ha reemergido en el norte del país debido a los efectos del cambio climático. Las seroprevalencias en habitantes de la amazonia son altas, variando de 28% a 64.4% de acuerdo a la región. A pesar de esto, la leptospirosis es aún considerada una enfermedad desatendida en el Perú, por lo que se cuenta con poca información respecto a su ciclo de transmisión y mantenimiento (14), dentro del cual los reservorios animales juegan un rol fundamental al ser portadores crónicos de la bacteria.

La información epidemiológica disponible hasta el momento en el Perú proviene principalmente del método de diagnóstico estándar de oro, el MAT, el cual, además de sus discutidas limitaciones, no sería un método adecuado para el estudio de los reservorios animales. Dada la cronicidad de la infección, los niveles de anticuerpos contra *Leptospira* en los reservorios serían difícilmente detectables mediante una técnica indirecta como el MAT, aun cuando estos reservorios podrían estar excretando la bacteria en la orina. Aunque existen métodos de detección directa como el cultivo microbiológico, estos resultan laboriosos y con poco éxito, dadas las particulares características biológicas de *Leptospira*. Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado un número de técnicas independientes de cultivo, basadas en la PCR, para la detección y tipificación directa del patógeno, las cuales no son aun completamente exploradas en nuestro país.

En la actualidad existe una creciente evidencia respecto a la participación de otros mamíferos domésticos distintos a los roedores, en el mantenimiento y transmisión de la leptospirosis. Este supuesto podría cobrar valor también en el Perú, visto los altos niveles de seroprevalencia reportados en animales como el cerdo con 89.6% (15) y el perro con 58% (16). Sin embargo, aún se desconoce qué cantidad de estos animales estarían excretando de manera efectiva la bacteria por la orina, debido principalmente a las limitaciones que presenta la detección directa de *Leptospira* por técnicas convencionales dependientes de cultivo. Asimismo, las altas seroprevalencias de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en cerdos (15) y *L. interrogans* serovar Canicola en perros (16), aun no son corroboradas de manera directa debido también a la falta de métodos independientes de cultivo que nos permitan tipificar las leptospirosis excretadas.

Es así que resulta oportuno el intento de emplear novedosas técnicas de diagnóstico y tipificación de *Leptospira* independientes de cultivo, para obtener información epidemiológica de reservorios domésticos no convencionales como el perro y el cerdo. Teniendo en cuenta la estrecha relación que mantienen con las actividades humanas y su posible impacto en la salud pública. Por lo tanto, el presente trabajo plantea responder la siguiente pregunta de investigación: ¿Existirá una asociación entre al menos un serovar o especie patógena de *Leptospira* y los tipos de reservorios domésticos no roedores que coexisten dentro de un área urbana de la amazonia peruana?

III. MARCO TEORICO

3.1. Leptospirosis

3.1.1. Generalidades

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana causada por los serovares patógenos del género *Leptospira*. El hombre es un hospedero accidental y contrae la enfermedad al exponer mucosas o abrasiones en la piel a fuentes de agua o suelo contaminadas con orina de animales. Estos portan crónicamente la bacteria en los túbulos renales, siendo los roedores los reservorios más importantes. Sin embargo, tanto mamíferos como aves, anfibios y reptiles, han sido reportados como portadores de alguna especie patógena de *Leptospira* (2,8,17).

La leptospirosis en el hombre tiene presentación clínica variable y en muchos casos autolimitante. Los signos clínicos van desde un síndrome febril inespecífico, hasta cuadros más severos y característicos como la enfermedad de Weil, que cursa con daño vascular generalizado, falla hepática y renal, o el síndrome de hemorragia pulmonar severa asociado a leptospirosis (SPHS por sus siglas en inglés) (17).

Se estima que entre un 5 a 15% de pacientes con leptospirosis desarrolla un cuadro severo de la enfermedad y al menos la mitad de ellos mueren debido, principalmente, a la SPHS (18). Aparentemente la severidad de la enfermedad y el pronóstico clínico estaría relacionado a los niveles de IgG en sangre, siendo los que presentan títulos de $IgG \geq 400$, los que desarrollan un cuadro pulmonar y renal más severo con pronósticos clínicos más pobres (19).

Dentro de la presentación clínica de la leptospirosis severa, alrededor del 50% de casos presenta daño vascular endotelial con coagulación intravascular diseminada (20), 25% presenta meningitis aséptica (17) y entre 16 a 40% presenta insuficiencia renal, usualmente no oligúrica, (21). Algunos otros signos incluyen mialgia, como efecto secundario de la diseminación bacteriana a través del cuerpo, y uveítis, presumiblemente por una respuesta autoinmune del hospedero. Por otro lado, algunos estudios sugieren que las complicaciones cardíacas serían más frecuentes de lo que se reporta (17).

La leptospirosis en animales, debido a la adaptación al hospedero, es generalmente subclínica o crónica. Principalmente se presentan problemas reproductivos como abortos, nacidos muertos e infertilidad, que afectan en su mayoría a la producción porcina y bovina (22). Por lo tanto la leptospirosis no solo tiene un impacto en la salud pública si no también en la industria pecuaria, de manera directa por las pérdidas debido a fallas reproductivas y de manera indirecta debido a restricciones en el comercio y exportación de carne o animales (23). A pesar de esto, la leptospirosis animal no tiene programas de vigilancia en muchos países endémicos, lo que ocasiona que el impacto real de la enfermedad en los animales aún no se conozca muy bien (11).

Debido al frecuente carácter autolimitante de la leptospirosis, el tratamiento con antibióticos es aún discutible, ya que en algunos casos no se encuentra un efecto significativo para acortar el curso de la enfermedad (24). Una revisión sistemática concluyó que aún no hay suficiente evidencia para establecer un esquema de antibioticoterapia para la leptospirosis. Sin embargo, bajo la experiencia médica, aun se sigue recomendando el uso de doxicilina para la

prevención y enfermedad leve, y las penicilinas para enfermedad severa (25). Además, el tratamiento con ceftraxiona, en pacientes con alergia a las penicilinas resulta una opción alternativa bastante razonable (26).

Como prevención, la vacunación es bastante común en animales, no así en humanos. Se ha comprobado que la vacunación en animales no evita la condición de reservorio, por lo que no interrumpiría el ciclo de transmisión de leptospirosis al hombre (8). Los principales inconvenientes que trae consigo la vacunación son los efectos secundarios que tienen las vacunas basadas en bacteria muerta y la corta protección de estas. Además, la heterogeneidad antigénica de *Leptospira* dificulta la creación de una sola vacuna válida en todos los contextos. Se necesitan estudiar aun los mecanismos de inmunidad del hospedero y su interacción con la bacteria, para el desarrollo eficaz de candidatos vacunales (8,17).

Uno de los retos que presenta la leptospirosis es la subestimación de su impacto en el mundo, afectando principalmente a poblaciones marginalizadas en países en vías de desarrollo (2). Debido a su sintomatología febril inespecífica, es muchas veces confundida con otras enfermedades tropicales como la influenza, malaria y dengue. Esto trae consigo una respuesta tardía en el tratamiento, complicaciones y pobres pronósticos clínicos (8,27,28). Distintos estudios alrededor del mundo sugieren que entre 5 a 69% de casos febriles inespecíficos negativos a malaria, podrían haber sido causados por *Leptospira* (1).

3.1.2. Epidemiología

La leptospirosis es la zoonosis con mayor distribución alrededor del mundo y una de las que tiene mayor impacto. Se estima que al año ocurren 1 030 000 casos

de leptospirosis y se producen 58 900 muertes en todo el mundo. La tasa de mortalidad a nivel mundial es de 6.85%. Los casos se presentan más en hombres que en mujeres, a un rango de edad de 20 a 29 años (1).

La morbilidad mundial se ha estimado en un promedio de 14.77 casos por 100 000 personas. El 73% de casos se reportan en países dentro de la región delimitada por el trópico de cáncer y el de capricornio. Las regiones con mayor morbilidad (casos por 100 000 personas) son Oceanía (150.68 casos), el sur y sureste de Asia (55.54), Caribe (50.68), África Sub-sahariana del este (25.65), Centro y Latino América (15.77 y 3.87), los andes y el trópico de América (21.90 y 13.53). Las regiones con mayor mortalidad (casos por 100 000 personas) son Oceanía (9.61 casos), el sureste de Asia (2.96) y el Caribe (2.90) (1,17).

La distribución de la leptospirosis se ve influenciada principalmente por 3 factores: la geografía, el clima y la condición socioeconómica. La geografía favorece la disposición de reservorios animales y las condiciones medioambientales la sobrevivencia de la bacteria. El clima favorece la continuidad de las infecciones, que aumentan durante los temporales y eventos climáticos extremos. Finalmente la condición socioeconómica aumenta el riesgo de exposición de las personas a fuentes de infección, tanto en los trabajos como en las viviendas (1).

La leptospirosis se distribuye en todo el mundo debido a su amplio rango de reservorios animales. Sin embargo, existen grupos de riesgo de exposición a leptospirosis. El personal en contacto con animales o medio ambiente contaminado, como matarifes, veterinarios, trabajadores de alcantarillado y personal militar. Además, personas que participan en actividades de recreación y deportes acuáticos (1).

La común subestimación de la morbilidad y mortalidad de la leptospirosis contribuye a que esta siga clasificada como una enfermedad desatendida. La mayoría de estudios utiliza información de vigilancia pasiva de los hospitales de países desarrollados, donde los porcentajes de mortalidad son notablemente menores a los países en vías de desarrollo de donde no se tiene mucha información (1). Además, dado el complejo diagnóstico y taxonomía de *Leptospira*, el no reportar el serovar que ocasiona la enfermedad, impide identificar y asociar la morbilidad o mortalidad a algún serovar en específico (1).

Otras importantes consideraciones para tener en cuenta son la mortalidad y morbilidad de la leptospirosis comparada a otras enfermedades. La mortalidad de la leptospirosis es similar a la de la rabia canina, que presenta 59 000 muertes al año alrededor del mundo (29). Por otro lado, la morbilidad de la leptospirosis es más alta que la de otras enfermedades tropicales desatendidas como la leishmaniasis visceral y el dengue severo, y es similar a la de equinococosis y cisticercosis (30). Cabe también señalar que en la actualidad no se conoce a ciencia cierta cuan altas son las pérdidas económicas que enfrenta el paciente y el gobierno a causa de la enfermedad.

3.2. *Leptospira* spp.

3.2.1. Generalidades

Leptospira es una bacteria aerobia tipo gram negativo, altamente motil. Su apariencia y motilidad varía mucho dependiendo del medio donde crecen, pero generalmente tienen forma helicoidal y una rotación en sentido antihorario. La bacteria presenta dos endoflagelos localizados en sus dos extremos, encargados de

girar en sentidos opuestos para producir el movimiento. Son bacterias oxidasa y catalasa positivas, de lento crecimiento a temperaturas entre 28 a 30°C y pH 7. Poseen un diámetro de 0.15 µm y largo de 10-20 µm, Una característica única es el extremo en forma de gancho o signo de interrogación (Figura 1) (2,8,31)

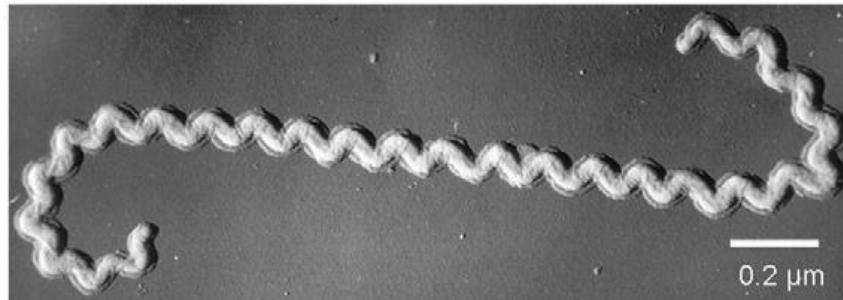


Figura 1. Morfología de *Leptospira* (tomado de Adler & De la Peña, 2010)

Su aislamiento es dificultoso y poco exitoso. Su incubación se da en aerobiosis a 29°C durante 16 semanas. El medio de cultivo ideal para aislamiento es el Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que contiene 1% de albumina sérica bovina y tween 20, como fuente de ácidos grasos de cadena larga que la bacteria está obligada a tomar del medio. Para su aislamiento primario a partir de muestras biológicas, se necesita hacer el medio selectivo con antibióticos como el 5-fluororacilo, sulfato de neomicina, polimixina B, rifampicina y vancomicina. En caso haya contaminación, esta puede ser observada a partir del día 3-4 y se puede subcultivar la bacteria a partir del día 7-21 en un medio sin antibióticos (31).

La pared celular de *Leptospira* está conformada por una membrana externa e interna separada por un espacio periplásmico cubierto por una matriz de peptidoglicano (Figura 2). En la membrana externa se encuentran proteínas como: *OmpL1*, *Lipl32*, *LigB*, *LenA*, *LenD* y *Loa22* (8). De estas, solo *Loa22* es la única que se ha comprobado como factor de virulencia por su adhesión al hospedero (32).

Otras proteínas de superficie importantes incluyen al *Lipl32 (Hap1)* y *Lig*. *Lipl32* es la lipoproteína de superficie más abundante (75%) de la membrana externa (33). Las Proteínas de *Leptospira* tipo inmunoglobulina (*Lig*, por sus siglas en inglés) son propuestas como virulentas, dada su participación en la interacción patógeno-hospedero. Sin embargo, aún no se ha podido demostrar experimentalmente (34).

El lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira*, dada su particular estructura y heterogeneidad antigénica, le confiere a la bacteria unas características peculiares. *Leptospira* activa a los macrófagos humanos mediante su LPS y, a diferencia de otras bacterias gram negativas que utilizan la vía TLR4, lo hace vía TLR2 (35). Aparentemente la composición química del lípido A del LPS (presencia de 1-metilfosfato ausente en otras bacterias gram negativas), es el que ocasiona que el sistema inmune humano se active vía TLR2 en vez TLR4 (36). Asimismo, esto explicaría el bajo potencial toxigenico del LPS como endotoxina, a comparación de otras bacterias gram negativas, cuyo LPS usualmente causa sepsis fulminante (31).

El LPS estaría también relacionado al curso clínico, agudo (infectado) o crónico (reservorio), que puede inducir *Leptospira* de acuerdo con el hospedero. En ratones, importantes reservorios, la activación del sistema inmune, a diferencia del humano, se da vía TLR2 y TLR4 (37). Mientras que la expresión del Ag O del LPS varía significativamente durante una infección aguda y crónica (38). A esto se suma la sugerente importancia del locus genético del LPS (operon *rfb*) para el desarrollo de nuevos métodos moleculares de diagnóstico y tipificación de *Leptospira*.

3.2.2. Virulencia y patogenicidad

Las leptospiras ingresan al hospedero por mucosas o por microabrasiones en la piel. Su forma helicoidal, su alta motilidad y algunas enzimas que degradan los componentes de la dermis (colágeno, elastinas y fibronectinas) (2), le ayudan a abrirse paso entre tejido conectivo a gran velocidad (39). En tan solo 1 hora post-inoculación se encuentran en sangre y diversos órganos como el cerebro. Cabe señalar que los mecanismos por los cuales atraviesa la placenta y la barrera hematoencefálica no están aun totalmente esclarecidos (40).

Las bacterias se translocan a través de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, se diseminan vía sangre y establecen en los órganos blancos. La respuesta inmune adaptativa del hospedero es primariamente humoral. Se activan las células endoteliales en respuesta y producen citoquinas y péptidos antimicrobianos, controlan la cascada de coagulación y regulan el tráfico de leucocitos. Las leptospiras son resistentes a la activación del complemento por la vía clásica y la vía alternativa (17,41).

Para su rápida diseminación, las leptospiras pueden valerse de adhesinas que se unen a varios componentes de las células hospederas (*LigB* y *OmpL1*), incluyendo la matriz extracelular, trombinas, fibrinógeno y plasminógeno. Por otro lado, las leptospiras pueden secretar proteasas y hemolisinas (esfingomielinasas y fosfolipasas) que pueden degradar la membrana celular del hospedero y ayudar a la invasión de los tejidos. Se ha visto *in vitro*, que *Leptospira* puede sobrevivir, replicar, y salir de los macrófagos induciendo apoptosis en estos (2).

Leptospira también produce autoanticuerpos en el hospedero. Se le ha relacionado con la producción de anti-cardiolipina como producto de una respuesta autoinmune que estaría relacionada al desarrollo de uveítis y en parte al síndrome de hemorragia pulmonar severa. De hecho, no solo las leptospiras halladas en los pulmones serían las causantes del daño, sino también un probable mecanismo autoinmune que cursa con depósito de inmunoglobulinas y complemento a lo largo de la membrana basal de los alveolos y espacios intra-alveolares, estarían también participando (8).

La osmolaridad y la temperatura regulan la expresión génica de *Leptospira*, dado que son importantes para la invasión al hospedero y la supervivencia de la bacteria (42). La bacteria puede sobrevivir por meses después de ser excretada, tanto en suelo húmedo como agua, formando agregados celulares o biofilms (43).

El hospedero puede tener susceptibilidad a la leptospirosis, tal como lo sugiere un estudio que encontró una relación entre el gen HLA-DQ6 y pacientes con leptospirosis en un brote de la enfermedad posterior a una triatlón (44). No hay evidencia de una vía de secreción de proteínas parecido al tipo III o tipo IV de otras gram negativas (8).

Una de las limitaciones del estudio de la patogénesis de *Leptospira* es la falta de técnicas exitosas para la introducción de material genético recombinante. Hasta ahora el único sistema con éxito variable es el transposón *HimarI mariner*. Si se podría mejorar este aspecto se podrían estudiar con más detalle los mecanismos metabólicos y fisiológicos involucrados en la patogenicidad de *Leptospira* (8). Otra limitación es el uso de modelos animales para los procesos de infección de *Leptospira*. En el laboratorio se necesitan altas dosis para infectar a los

reservorios naturales (10^8 leptospiras/ml en ratas y ratones para modelo crónico, y 10^2 leptospiras/ml en cuyes y hamsters para modelo agudo) (8). A pesar de que también se hallan desarrollado modelos experimentales de leptospirosis en primates, este aún sigue siendo un gran inconveniente (45).

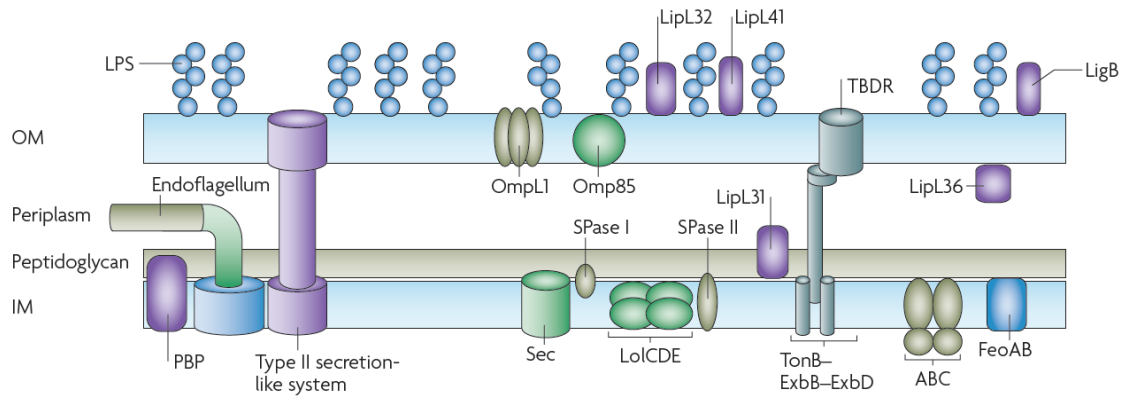


Figura 2. Pared celular de *Leptospira* (tomado de Ko, 2009)

3.2.3. Taxonomía

Las espiroquetas son bacterias que divergieron tempranamente en la evolución bacteriana. La familia *Leptospiraceae* incluye al género *Leptospira* y *Leptonema* (46). En los primeros reportes, todas las leptospiras patógenas eran incluidas en la especie *Interrogans* y las no patógenas o saprofitas en la especie *Biflexa*. Luego, un estudio de Yasuda y colaboradores basado en hibridación ADN-ADN fue el primero en identificar 7 genomoespecies (47). Tiempo después, otro estudio propuso clasificar al género *Leptospira* en 17 especies en base a la hibridación ADN-ADN. (48). En la actualidad, en base a métodos de hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen *rrs* (16S), se ha clasificado el género en 23 especies, discretamente separadas en 3 grupos que coinciden con su habilidad para causar enfermedad. Diez especies son patógenas, las cuales a su vez se subdividen

en 4 subgrupos. Seis especies son patógenas intermedias (no se observa a *L. venezuelensis*), las cuales han sido aisladas de humanos y animales, sin embargo, su patogenicidad no está del todo esclarecida. Siete especies son saprofitas (no se observa a *L. idonii*), las cuales no pueden causar enfermedad (49) (Figura 3).

A pesar de la clasificación genética en especies, por motivos epidemiológicos se utiliza la clasificación serológica, donde la unidad taxonómica es el serovar. Esta se basa en la heterogeneidad estructural del componente carbohidrato (Antígeno O) del LPS de *Leptospira*. Generalmente los serovares tienen una preferencia o están relacionados a un tipo de hospedero o una región geográfica delimitada. La base molecular de esta relación aún no está bien entendida (2).

La clasificación en serovares se determina por la prueba de absorción de aglutinina cruzada (*Cross-agglutinin absorption test* o CAAT), cuya dificultad técnica la centraliza solo a laboratorios de referencia. A aquellos serovares que tienen reacción inmune cruzada, es decir están antigénicamente relacionados, se les agrupa también en serogrupos (2). La clasificación en serovares o serogrupos no guarda estricta relación con la filogenética de las cepas ya que los serovares de un mismo serogrupo pueden pertenecer a distintas especies genéticas (31). Se presume que esto se debe a un mecanismo relacionado con la transferencia horizontal de genes del locus *rfb*, el cual está encargado de la biosíntesis del LPS de *Leptospira* (50). Como la clasificación serológica no coincide totalmente con la genética, en la actualidad se utilizan ambas (8).

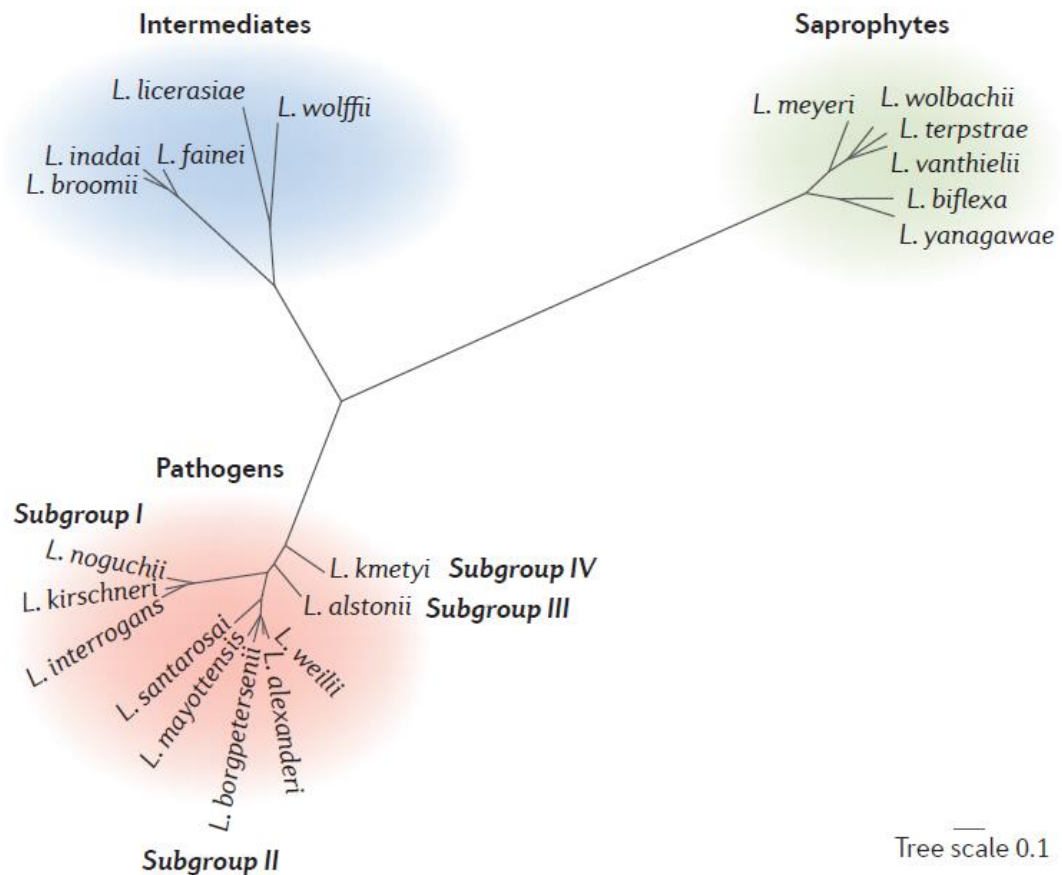


Figura 3. Clasificación de *Leptospira* de acuerdo a las especies del género (Tomado de Picardeau, 2017)

Hoy en día, la galopante aparición de modernas técnicas de secuenciación de genoma completo, su rápido mejoramiento y abaratamiento de costos harán que esta se encuentre pronto más disponible. Así, podría ser el próximo estándar de oro para una clasificación taxonómica de *Leptospira* unificada, dejando obsoletas a las actuales técnicas moleculares y las convencionales técnicas serológicas (2).

3.2.4. Genómica

La mayoría de genes en el genoma de *Leptospira* no tiene ortólogos en el genoma de otras espiroquetas (8). La función de aproximadamente 59% de genes de *Leptospira* es aún desconocida, sugiriendo mecanismos de patogenicidad únicos

para esta bacteria (8). La primera cepa en ser secuenciada fue *Leptospira interrogans* serovar Lai (51). Se encontraron 2 cromosomas, uno de 4.33 Mb y otro de 359 Kb, con un total de 4768 genes predichos, de los cuales 4727 serían codantes (CDs). 4360 genes estarían en el cromosoma I y 367 en el cromosoma II. Además, se encontraron 37 genes codificantes para tARN, 2 genes para 16S rARN, 1 para 5S rARN y otro para 23S rARN. La deficiencia de genes que codifiquen para tARN y rARN podrían explicar lo difícil del cultivo y crecimiento de *Leptospira in vitro* (51). Hasta el momento se han registrado más de 470 accesos de secuenciación de genomas completos para la especie *Leptospira* spp. en el repositorio Genbank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=leptospira>), sin embargo, el genoma de la especie saprofita *L. idonii* aún no ha sido secuenciado completamente (Tabla 1).

Tabla 1. Numero de genomas completos secuenciados para el género

Leptospira spp. (Fuente: Genbank, NCBI)

Género <i>Leptospira</i> spp.	N° de genomas completos secuenciados
Leptospiras patógenas	
<i>L. interrogans</i>	297
<i>L. kirschneri</i>	31
<i>L. santarosai</i>	41
<i>L. borgpetersenii</i>	38
<i>L. weilii</i>	18
<i>L. noguchii</i>	15
<i>L. mayottensis</i>	6
<i>L. alstonii</i>	2
<i>L. alexanderi</i>	6
<i>L. kmetyi</i>	1
Leptospiras intermedias	
<i>L. licerasiae</i>	6
<i>L. inadai</i>	2
<i>L. wolffii</i>	1
<i>L. fainei</i>	1
<i>L. broomii</i>	1
<i>L. venezuelensis</i>	1
Leptospiras saprófitas	
<i>L. biflexa</i>	2
<i>L. meyeri</i>	2
<i>L. terpstrae</i>	1
<i>L. yanagawae</i>	1
<i>L. vanthielii</i>	1
<i>L. wolbachii</i>	1
<i>L. idonii</i>	0

Los análisis pan-genómicos del género *Leptospira* ha mostrado que hay una alta variabilidad dentro del género, el tamaño del genoma va desde 3.8 a 4.6 Mb y su contenido de GC de 35 a 45%. Sin embargo, el genoma nuclear consiste en aproximadamente 1100 genes para todas las especies (52). Además, estos análisis han sugerido que ciertos mecanismos como la transferencia genética horizontal, la

duplicación de genes y la reducción genómica han jugado un papel importante en la evolución de la condición saprofita a patógena, y su adaptación a ciertos hospederos (52).

La composición genómica en leptospiros patógenas, patógenas intermedias y saprofitas, varía ampliamente. Un análisis pan genómico (49) reveló que solo las leptospiros patógenas tienen genes relacionados a la familia de proteínas modificadoras de virulencia, y genes que codifican para la familia de proteínas que contienen motivos leucine-rich repeat (LRR), además de proteínas miembro de las familias de WGR, peptidasas, esfingomielinasas y enzimas proteolíticas extracelulares (colagenasas y termolisinas). Además de genes requeridos para la síntesis de Vitamina B12 y ácido siálico (rol en la modificación de proteínas de superficie). Sin embargo, algunos genes como el que codifica para la oxigenasa *haem*, importante para la asimilación de hierro, está presente tanto en patógenas, saprofitas y patógenas intermedias. Mientras que la familia de proteínas relacionadas a CRISPR-Cas tipo I y regiones de profagos están presentes en leptospiros patógenas y algunas patógenas intermedias, pero ausentes en saprofitas (Figura 4) (2).

Lo que es más, los análisis genómicos recientes han logrado dividir al grupo patógeno en 4 subgrupos que coincidentemente también están relacionados en cuanto a sus mecanismos de patogenicidad (49). El subgrupo 1 contiene a *Leptospira interrogans*, *kirschneri* y *noguchii*. Este subgrupo tiene las mismas familias de proteínas virulentas, tales como la familia de proteínas asociadas a metaloproteinasa y la familia de proteínas de modificación de virulencia, lo que refleja la importancia de estas familias de proteínas para la virulencia de *Leptospira*.

Este subgrupo incluye a los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni que típicamente están relacionadas con un mal pronóstico clínico (52). El subgrupo 2 contiene a *Leptospira santarosai*, *mayottensis*, *weilii*, *alexanderi* y *borgpetersenii*, este último incluye a cepas con genoma más pequeño y menor contenido de genes que otras especies patógenas y saprofitas, debido probablemente a una evolución adaptativa al hospedero y que estaría relacionado también a su poca capacidad para sobrevivir fuera de este. El subgrupo 3 y 4 solo se componen de una sola especie, *Leptospira alstoni* y *Leptospira kmetyi* respectivamente. Estas dos especies exhiben características que indicarían que evolucionaron de manera distinta a las otras especies patógenas (49) (Figura 4).

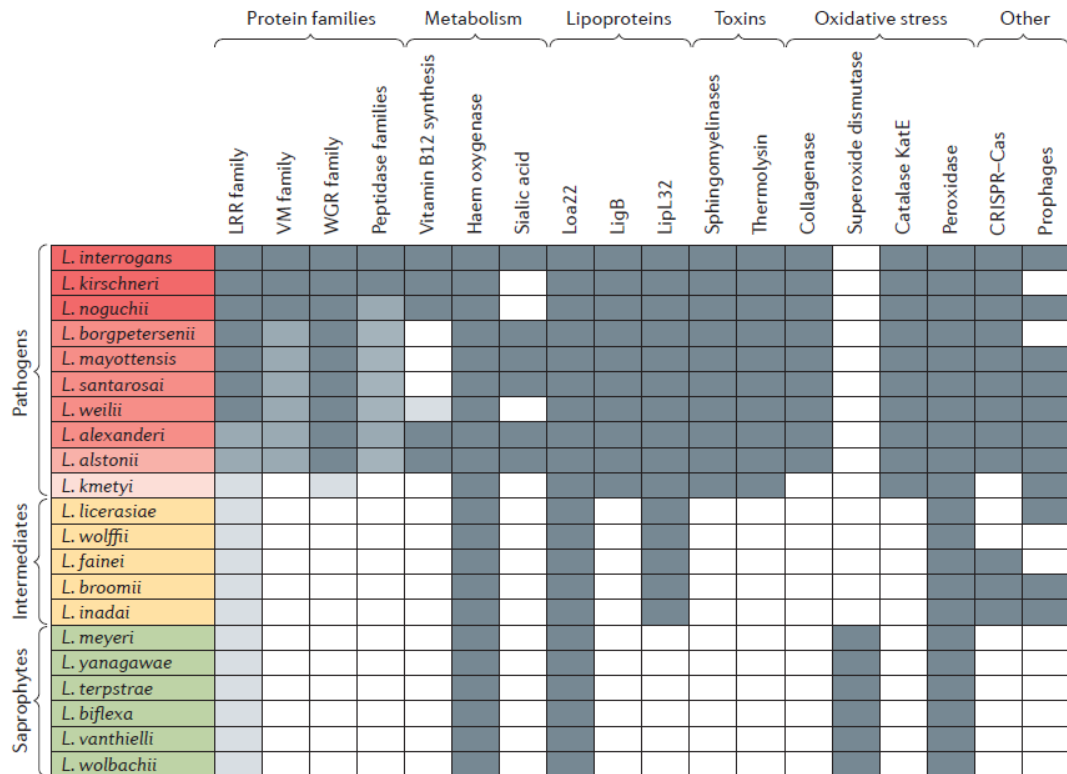


Figura 4. Distribución de genes de virulencia en las distintas especies de *Leptospira* (tomado de Picardeau, 2017).

3.3. Transmisión y mantenimiento de la leptospirosis

Dentro del ciclo de transmisión de *Leptospira*, participan los animales, el medio ambiente y el hombre (Figura 5). La transmisión humano-humano aún no está bien documentada, sin embargo, existe un riesgo potencial en el contacto sexual y de manera vertical durante el embarazo y la lactación (8,53). Después de que los seres humanos adquieren la bacteria, esta permanece en el torrente sanguíneo alrededor de 1 semana (leptospiremia), de donde es eliminada por los anticuerpos aglutinantes que empiezan a aparecer. Luego migra hacia los túbulo renales, siendo excretada en la orina (leptospiruria) por un período aproximado de 3 semanas (54). El curso clínico de la enfermedad en humanos no induce a un estadio de reservorio como si ocurre en el caso de los animales (8).

Un serovar de *Leptospira* suele estar adaptado a un determinado hospedero, como es el caso del serovar Icterohaemorrhagiae en ratas, Ballum en ratones, Hardjo en vacas, Bratislava en caballos, Cynopteri en murciélagos, Canicola en perros y Pomona en cerdos (17). Sin embargo, también hay serovares adaptados a diversos reservorios o una misma especie animal que sirve como reservorio para diversos serovares de *Leptospira*, dependiendo de la región donde se encuentre (11). Por ejemplo, la mangosta hindú (*Herpestes auropunctatus*), además de ser reservorio del serovar icterohaemorrhagiae también es reservorio del serovar Sejroe en Hawaii, Djatzi en Puerto Rico, Jules en Jamaica, Brasilensis en Granada y Canicola en Trinidad y Tobago (17).

Mientras se piensa que los roedores son los reservorios más importantes de *Leptospira* y principal fuente de contaminación para los humanos, algunos estudios han empezado a valorar el rol de otros mamíferos domésticos como reservorios.

Las investigaciones apuntan a los perros, vacas y cerdos como posible fuente de infección para los humanos, basándose en el impacto que tiene la carga bacteriana de la orina que es excretada (9,10).

Si bien es cierto, los roedores excretan mayor carga bacteriana en la orina (hasta 10^7 leptospiras/ml durante más de 9 meses) (38), el volumen que pueden excretar es considerablemente menor al de los otros reservorios domésticos no roedores. Algunos estudios sugieren una participación de perros, cerdos y vacas en el ciclo de transmisión y mantenimiento de leptospirosis, dada su estrecha relación con las actividades humanas diarias (9,55). Asimismo, las altas seroprevalencias de leptospirosis en reservorios no roedores contribuirían con esta teoría. En el Perú se ha encontrado una seroprevalencia de 89.6% en cerdos (15), 58% en perros (16) y 14.7% en vacunos (56). Por tal motivo, estos reservorios merecen que se les preste la debida atención en los estudios de la epidemiología de la enfermedad, más aún en un escenario endémico como el de la amazonia peruana, donde los seres humanos están en constante exposición al patógeno y en cercana relación a animales domésticos como los perros y cerdos.

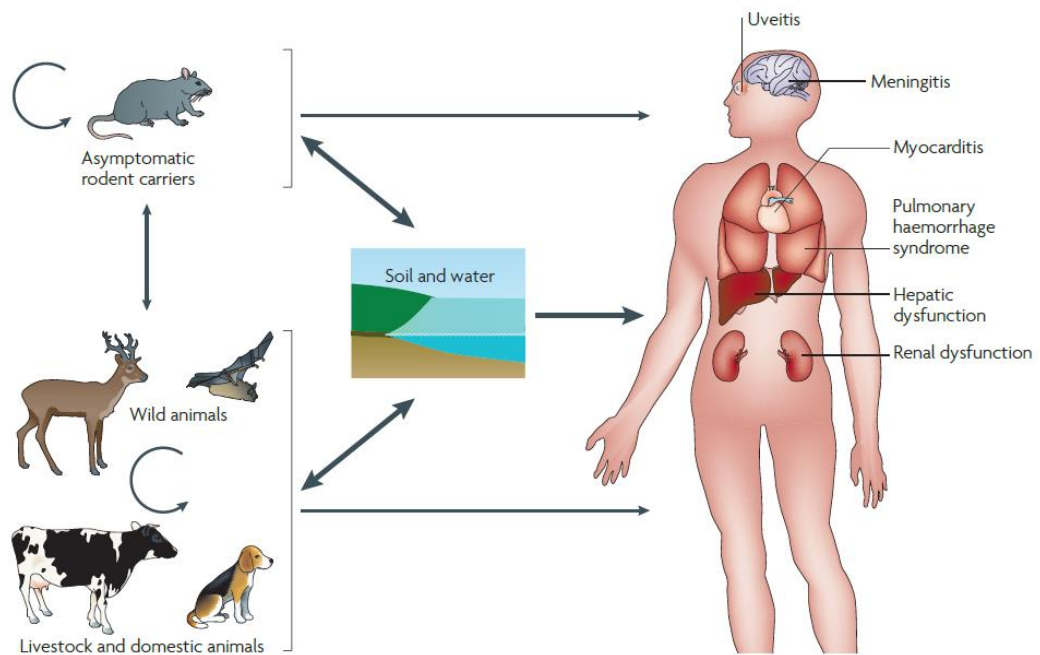


Figura 5. Ciclo de transmisión de la leptospirosis (tomado de Ko *et al.*, 2009)

3.4. Diagnóstico y tipificación de *Leptospira* spp.

Los métodos de diagnóstico y tipificación convencionales incluyen principalmente el método directo de cultivo microbiológico, y los métodos indirectos de ELISA y el Test de Aglutinación Microscópica (MAT). Mientras que los métodos de modernos de diagnóstico directo se basan principalmente en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes (Tabla 2).

El cultivo microbiológico es lento e insensible. La bacteria se puede aislar en humanos de sangre y líquido cefalorraquídeo en los 7 a 10 días de iniciada la enfermedad, y de la orina a partir de la 2da a 3ra semana de enfermedad. Incluso bajo óptimas condiciones, los organismos son de lento crecimiento y los cultivos solo se pueden reportar negativos como mínimo después de 16 semanas de incubación (54).

El test de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba estándar de oro para el diagnóstico serológico de *Leptospira*. Aparentemente no es muy fiable para identificar el serovar infectante en el individuo pero puede servir para identificar el serogrupo circundante en una población (57). Además, debido a su complejidad técnica y necesidad de experiencia, esta relegada a unos cuantos centros de diagnóstico de referencia (11).

Por otro lado, el método de ELISA que detecta anticuerpos IgM anti-*Leptospira*, tiene cierta ventaja ya que estos aparecen durante la primera semana de la enfermedad cuando un tratamiento antibiótico oportuno aún tiene probabilidad de éxito. Por lo tanto, esta técnica puede detectar pacientes positivos a leptospirosis antes que el MAT, aunque siempre necesita ser confirmado por este (58) y a diferencia del primero no ofrece información a nivel de serovar, lo que significa una desventaja epidemiológica (11).

Sin embargo, ambas pruebas al ser métodos indirectos serológicos solo pueden ser aplicables cuando se da la seroconversión en el paciente. Es en esta etapa en la que los tratamientos antibióticos tienen menor porcentaje de éxito. Asimismo, el uso de estas pruebas serológicas en los reservorios animales no es muy fiable. Estos al ser estos portadores crónicos presentan niveles de anticuerpos muy bajos, por lo que su condición de portador es difícilmente detectado, facilitando el mantenimiento del ciclo de infección (11).

En cuanto al diagnóstico y tipificación molecular se pueden mencionar diversos métodos basados en la PCR, la secuenciación del gen *rrs* (16S) y el gen *secY*, el Análisis Multilocus de Repeticiones en Tandem de Numero Variable (MLVA por sus siglas en ingles), la Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST

por sus siglas en inglés), la Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) y el análisis de *Melting* de alta resolución (HRM por sus siglas en inglés) (12). En muchos casos estos métodos coinciden parcialmente con la clasificación serológica, en especial los ampliamente difundidos MLVA y MLST. (59). A diferencia de las pruebas serológicas indirectas, los métodos moleculares directos son muy efectivos en etapas tempranas de la enfermedad, cuando el diagnóstico es crucial para un correcto tratamiento antibiótico.

En la actualidad se considera al HRM una técnica menos laboriosa y más rápida que el MLVA y MLST, que requieren secuenciación y electroforesis como pasos adicionales a la PCR. El análisis HRM se realiza en un solo tubo de reacción y es conservadora de la muestra, lo cual constituye una ventaja importante ya que los productos de la PCR pueden ser sometidos a análisis posteriores.

La técnica se realiza después de la polimerización de los amplicones y consiste en medir la fluorescencia en tiempo real durante variaciones muy finas de temperatura de 0.008 a 0.2°C, durante un incremento constante de esta. El nivel de fluorescencia es inversamente proporcional al incremento de temperatura. Dado que la doble hebra de los amplicones se va denaturando, esta va perdiendo fluoróforo. El pico de *melting* o Temperatura de *melting* (T_m) se considera cuando la mitad de las cadenas de ADN de los amplicones se encuentran separadas y la otra mitad no. El pico varía de acuerdo a la naturaleza de la secuencia amplificada, su tamaño y contenido de Guanina-Citosina.

La técnica de HRM se ha utilizado junto a la amplificación por PCR de secuencias polimórficas del ADN de *Leptospira* spp. El empleo de esta técnica para

identificación molecular a nivel de especie, ha demostrado tener éxito y un buen poder discriminatorio (13).

Entre otras razones, las limitaciones en los métodos de diagnóstico de la leptospirosis ocasionan su subdiagnóstico y de esta manera contribuye a subestimar el riesgo real que esta representa. Los retos que enfrenta el diagnóstico y tipificación de *Leptospira*, están relacionados a la falta de estandarización de sus procesos y el establecimiento de una base de datos accesible a nivel mundial ya que la mayoría de los países endémicos no tiene un sistema de notificación obligatoria. Una mejora en el diagnóstico evidenciaría la real dimensión de la enfermedad de manera tal que se podrían plantear programas de control y evitar pérdidas humanas y económicas, tanto en el ámbito de salud pública como en la producción animal (11).

Tabla 2. Comparación de métodos convencionales para el diagnóstico de leptospirosis (Modificado de Hartskeerl, 2011).

Método	Sensibilidad ^a	Especificidad ^a	Costo (€) ^b	Ventajas	Desventajas
Cultivo	5-50%	100%	20	Otorga evidencia. Aplicación en animales y humana	Lento, poco éxito y dificultoso
Microscopia de campo oscuro	10 ⁴ bacteria/ml	Baja, confusión con fibras de proteína	<1	Diagnóstico rápido y temprano. Aplicación en animales y humanos	No confiable, requiere confirmación
Test de Aglutinación Microscópica (MAT)	90%	>90%	160	Estándar de oro. Aplicación en animales y humanos	Requiere un panel de antígenos vivos, dificultoso (necesita experiencia), laborioso (>3 h), diagnostico indirecto. Inconveniente para diagnóstico de reservorios animales seronegativos
ELISA IgM <i>in house</i>	84%	99%	48	Costo efectivo, puede ser realizado sin lector de ELISA	Laborioso (4 h), diagnostico indirecto. Uso en animales limitado
ELISA IgM comercial	>90%	88-95%	9-16	Costo efectivo, relativamente rápido (1-2 horas)	Diagnostico indirecto
ELISA IgG	90%	95%	6	Rápido (1 hora)	No diagnostica la respuesta inmune temprana
Test de Dri Dot	82%	95%	5-7	Fácil, rápido (30 segundos), costo efectivo	Diagnostico indirecto, necesita confirmación por MAT. No uso en animales
Inmunoensayo de Flujo Lateral	81%	96%	2-5	Fácil, rápido (10 min), sangre por pinchazo en el dedo, costo efectivo	Diagnostico indirecto, necesita confirmación por MAT
PCR en tiempo real	100%	93%	100	Diagnóstico temprano. Aplicación en animales y humanos	Pocos protocolos validados, sofisticado, equipo caro, necesita experiencia

^a Referencial, los porcentajes pueden variar dependiendo de factores no controlables como tipo de muestra, estadio de enfermedad, etc.

^b No incluyen costos de equipos. Referencial, los costos pueden variar dependiendo de factores no controlables.

IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana reemergente en el mundo entero y endémica en la amazonia peruana (3). Su ciclo de transmisión tiene como reservorio a un amplio rango de animales. El estudio de esta enfermedad se ve limitado por sus métodos de diagnóstico, lo que sumado a su sintomatología inicial inespecífica, ocasiona una subestimación del real impacto en la salud pública (11). Asimismo, el desarrollo de técnicas que se enfoquen en el diagnóstico directo y tipificación de *Leptospira* tanto en animales, hombre y medio ambiente, constituye una necesidad de especial atención.

Este estudio pretende evidenciar una posible asociación de leptospiras patógenas con reservorios animales no roedores en el escenario endémico de la amazonia peruana, mediante el uso de técnicas moleculares para la detección directa, cuantificación y tipificación de leptospiras patógenas excretadas en la orina de perros y cerdos de Belén, Iquitos. Lo cual significaría un importante aporte al conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis en el Perú, a la vez que permitiría explorar el potencial que tienen los métodos moleculares actuales para facilitar el diagnóstico directo de *Leptospira*.

Dado el potencial impacto que tiene la leptospirosis en las regiones tropicales vulnerables al cambio climático como la amazonia peruana, es necesario investigar los reservorios animales que permiten su mantenimiento y transmisión, para idear medidas de control y prevención bajo el concepto de “Una salud”, en las poblaciones en riesgo.

V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

Existe asociación entre al menos una especie patógena de *Leptospira* y su reservorio doméstico, perro o cerdo, perteneciente a los sectores 20 y 21 de Belén, Iquitos.

5.2. Objetivos

5.2.1. General

Determinar si existe asociación entre alguna especie de *Leptospira* patógena y su reservorio doméstico, perro o cerdo, pertenecientes a los sectores 20 y 21 de Belén, Iquitos.

5.2.2. Específicos

1. Identificar y cuantificar las leptospiras patógenas excretadas por reservorios domésticos, perros y cerdos, de los sectores 20 y 21 de Belén mediante qPCR *Lipl32*.
2. Identificar a nivel de especie, las leptospiras patógenas excretadas por perros y cerdos, usando el gen *rrs* (16S).
3. Estandarizar un protocolo de PCR en tiempo real basado en el análisis de *melting* de alta resolución del gen *rfbX*, para la identificación de leptospiras patógenas a nivel de serovar.

4. Identificar a nivel de serovar, las leptospiras patógenas excretadas por perros y cerdos, usando el protocolo de PCR más análisis de *melting* de alta resolución estandarizado.
5. Analizar la asociación que existe entre especie patógena de *Leptospira* excretada y el tipo de reservorio doméstico no roedor, perro o cerdo.

VI. METODOLOGIA

6.1. Diseño del estudio

El presente es un estudio observacional descriptivo transversal. Se realizó en Belén, una localidad urbana de la amazonia peruana con alta incidencia de leptospirosis (60). Las muestras se obtuvieron dentro del marco del proyecto matriz “Rol de los animales domésticos en transmisión de leptospirosis y bacterias resistentes a antibióticos en Iquitos” (SIDISI: 63691), con las consideraciones éticas pertinentes.

Se colectaron muestras de orina de perros y orina y riñón de cerdos. En todas las muestras se procedió a cultivar *Leptospira* spp. Solo a las muestras de orina se les extrajo ADN y fueron sometidas a PCR en tiempo real para detectar y cuantificar ADN de leptospirosis patógenas. A las muestras positivas se les realizó una PCR convencional y secuenciación del gen *rrs* (16S) para determinar su especie.

Posteriormente, se estandarizó un protocolo para tipificación de serovares patógenos de *Leptospira*, basado en PCR en tiempo real con análisis de *Melting* de alta resolución (PCR-HRM por sus siglas en inglés). Este fue desarrollado por el mismo grupo de investigación en la Universidad de California, San Diego. Una vez estandarizado, el protocolo fue utilizado para determinar el serovar al que pertenecían las muestras positivas a *Leptospira*, provenientes de orina de perro y cerdo. Finalmente se realizaron los análisis estadísticos para: (1) determinar si existía diferencia estadística entre la cuantificación de ADN de leptospirosis en muestras de cerdos y perro, (2) determinar si la excreción de leptospirosis patógenas

en la orina (leptospirosis) está asociada al tipo de reservorio, y (3) determinar si existía asociación entre las especies patógenas de *Leptospira* spp. identificadas en las muestras de orina y el tipo de reservorio, perro o cerdo. Un flujograma del diseño del estudio se observa en la figura 6.

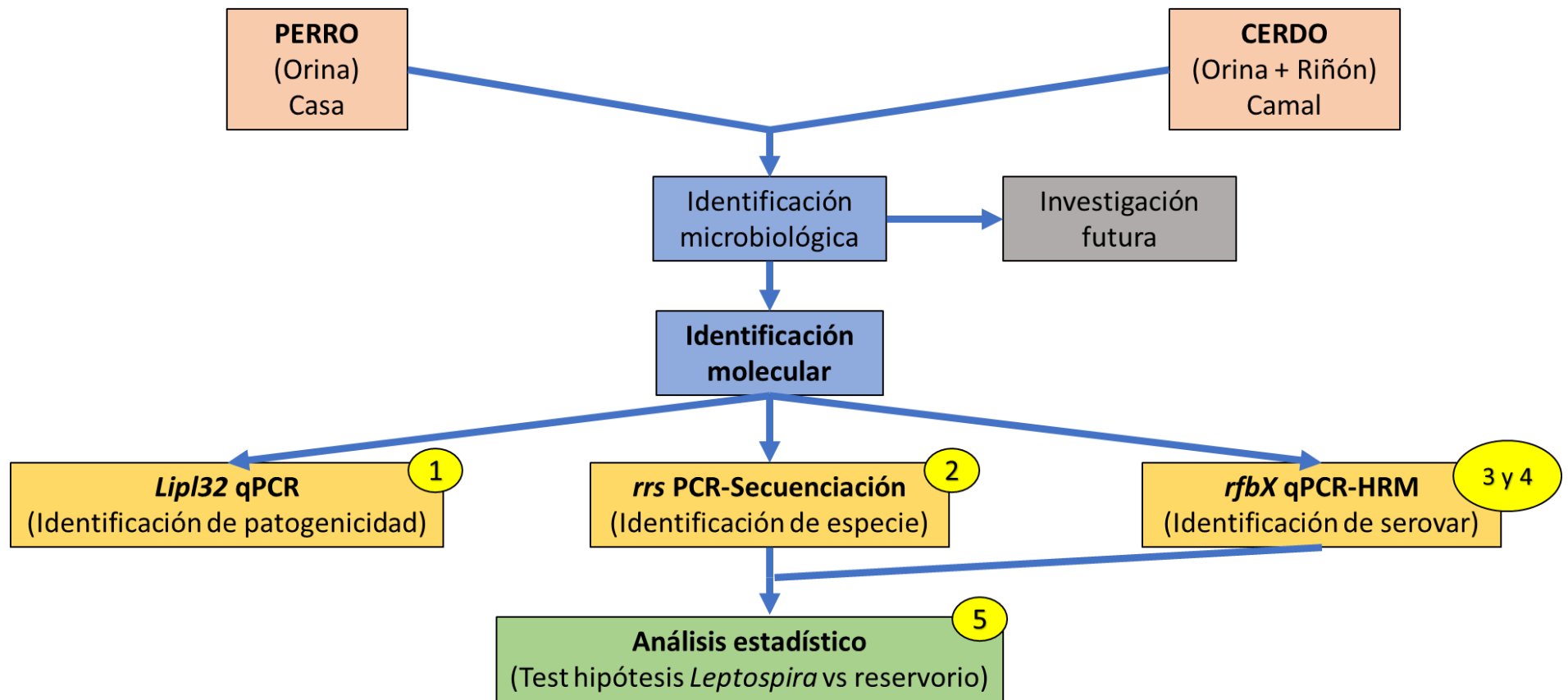


Figura 6. Flujo de la metodología del estudio. Los círculos amarillos del 1 al 5 corresponden a los objetivos del estudio.

6.2. Población

Las muestras fueron colectadas en los sectores 20 y 21 del distrito de Belén. La parte baja de estos sectores se encuentra asentada en el río Itaya y en época de lluvia, de diciembre a marzo, es inundada por su caudal. La parte alta limita con el mercado de Belén y se mantiene seca durante todo el año (Figura 7).

En Belén se observan pobres condiciones sanitarias, mala disposición de desechos, ineficiente sistema de alcantarillado y agua potable, y un crecimiento demográfico desordenado que ha llevado a su población al hacinamiento. La población canina no tiene ningún plan de control ni prevención de enfermedades. Se observan bastantes perros callejeros y los que tienen propietario generalmente se encuentran en una descuidada condición sanitaria y nutricional (Figura 8). Por otro lado, la crianza de cerdos se hace de manera informal y su beneficio en camales no está regulado, por lo que no fueron declarados en las visitas a las viviendas. Esto representó una limitante para estimar su población y colectar sus muestras.

Todas estas condiciones representan un claro riesgo para la salud pública y un escenario donde el mantenimiento del ciclo de transmisión de *Leptospira*, reservorio-ambiente-humano, se ve facilitado. Además, el carácter endémico de la enfermedad y la estrecha relación de los animales con las actividades humanas hace de la población de Belén un adecuado modelo para estudiar la relación serovar-reservorio en un ambiente urbano de la amazonia peruana.

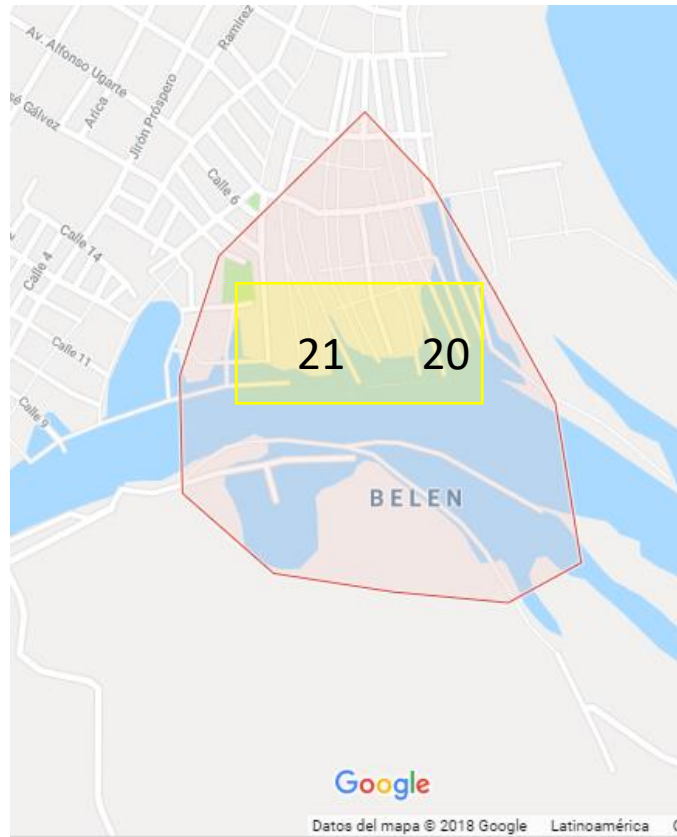


Figura 7. Localización de Belén (Maynas, Loreto). Sector 20 y 21 delimitados en recuadro amarillo (Fuente: Google Maps, 2018).



Figura 8. Canes en una vivienda de Belén

6.3. Muestra

El tamaño de muestra fue calculado en base al objetivo principal, mediante el software STATA 13 (StataCorp LLC, TX), usando la fórmula para comparación de dos proporciones. Tomando seroprevalencias reportadas anteriormente de 58% para perros (16) y 85.8% para cerdos (15), un poder estadístico de 80% y un nivel de significancia de 5%, se estimó una muestra mínima de 40 perros y 39 cerdos. Además, para el primer objetivo específico (identificación de leptospiras patógenas excretadas o prevalencia de leptospirosis) se calculó un tamaño de muestra para estimar una proporción. Se utilizó una estimación de la población canina de unos 330 animales en los dos sectores, mientras que, dada la informalidad de la crianza porcina, su población no se pudo estimar y se calculó el tamaño de muestra en base a una población infinita. Con un nivel de confianza de 95%, error de 0.05 y utilizando seroprevalencias de 58% para perros (16) y 85.8% para cerdos (15), reportadas anteriormente en Perú, se calculó una muestra de 176 perros y 186 cerdos.

La recolección de muestras se realizó durante la temporada de lluvias (enero a marzo) del 2017, como parte del proyecto: “Rol de los animales domésticos en transmisión de leptospirosis y bacterias resistentes a antibióticos en Iquitos” (SIDISI: 63691). Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para los canes fueron: Pertenecer a los individuos enrolados en el mencionado proyecto, dentro de los sectores 20 y 21 de Belén y ser animales no agresivos mayores a 3 meses, aparentemente saludables. En tanto para los cerdos fueron: Haber sido beneficiados en 3 camales informales que únicamente recibían animales de los sectores 20 y 21 de Belén y haber sido beneficiados dentro de las 4 horas de la toma de muestra.

Las muestras de perro consistieron en orina estéril. Se colectaron mediante sonda urinaria o punción suprapúbica, minimizando los procedimientos que pudieran causarle molestias innecesarias al animal. Las muestras de cerdos consistieron en orinal estéril y riñón del mismo animal. Se colectaron post-mortem, mediante punción estéril directamente de la vejiga y disección del riñón completo. En todo momento se utilizaron los implementos necesarios para mantener las condiciones de asepsia y bioseguridad y evitar cualquier riesgo para el ambiente y operario.

Se colectaron un total de 127 muestras de orina de perros, 123 muestras de orina de cerdo y 161 riñones de cerdo. El limitado número de muestras de cerdo se debió a la complicada logística y dificultades propias para obtener el material biológico en mataderos informales, los cuales no ofrecían las garantías necesarias para la seguridad del investigador al momento de la toma de muestras. Por lo tanto, el error de la formula cambió a 0.07 conservando los otros parámetros, para poder obtener un tamaño de muestra representativo de 124 perros y 96 cerdos.

El almacenamiento, tratamiento y preparación de las muestras para su envío, se hizo en el Laboratorio Satélite de Iquitos de La Universidad Peruana Cayetano Heredia (LSI-UPCH). El procesamiento de las muestras y análisis de resultados se realizó en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la misma universidad (LID-UPCH).

6.4. Procedimientos y técnicas

6.4.1. Obtención de ADN a partir de serovares de referencia de *Leptospira*

Para el presente trabajo se utilizaron 21 serovares referencia de *Leptospira*, amablemente donados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés), que incluyen 15 de los 19 serovares representantes del género, recomendados para el diagnóstico de Leptospirosis por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (54). De los 21 serovares, 19 eran patógenos, 1 patógeno intermedio (*L. licerasiae*) y 1 saprofito (*L. biflexa*) (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de serovares de referencia utilizados en este estudio

Código	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1M	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
2M	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3M	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
4M	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
5M	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
6M	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
7M	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
8M	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
9M	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
10M	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
11M	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT 117
12M	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
13M	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
15M	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ214
16M	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
17M	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolfii	3705
19M	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Mankarso	Mankarso
20M	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
21M	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
22M	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
23M	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR010
24M	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc I

Las cepas referencia fueron cultivadas en medio EMJH líquido e incubadas en aerobiosis por un espacio de 4 a 6 días a 29°C. Al término de este tiempo se contabilizaron en la cámara Petroff Hausser para confirmar que se encontraban en su fase logarítmica (2 a 4×10^8 leptospiras/ml) (54). Se extrajo el ADN a partir de 1.5 ml de medio EMJH líquido, usando el kit comercial “*GeneJET Genomic DNA Purification Kit*” (Thermo Fisher Scientific) para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Solo se modificó la elución, en lugar de utilizar 200 µl se utilizaron 90 µl de buffer. Se midió la concentración del ADN extraído mediante fluorometría con Qubit 1.0 (Invitrogen), se alicuotaron 2 tubos por cepa y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Adicionalmente se manipularon, como control negativo, las bacterias Gram (+): *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus pseudintermedius*. Y las Gram(-) : *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, gentilmente donados por la Facultad de Medicina Veterinaria de UNMSM y el Laboratorio de Enfermedades Entericas, Nutricion y Resistencia Antimicrobiana del IMTAvH-UCPH. Estas bacterias también fueron sometidas al mismo método de extracción de ADN mediante kit comercial.

6.4.2. Detección de leptospiras patógenas mediante cultivo microbiológico

Se inocularon 0.5 ml de la orina colectada en 5 ml de medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido modificado con antibióticos (0.01% 5-Fluororacilo y sulfato de neomicina 300 µg/ml). En el caso de las muestras de riñones, se escindió un área aproximada de 1 cm³, comprendiendo corteza y medula renal, se trituró y homogenizó en 1 ml de PBS 1X. Del homogenizado se tomó 0.5 ml para ser inoculado en 5 ml de medio EMJH

semisólido modificado con antibióticos. Se trabajó siempre bajo condiciones de esterilidad, en una cabina aislada, usando un mechero bunsen, reactivos y materiales estériles.

Los tubos de medio inoculados, tanto de riñones como orina, se mantuvieron a temperatura ambiente (alrededor de 27°C) por aproximadamente 4 semanas, hasta su envío a Lima. Luego se incubaron por 12 semanas más a 29°C en aerobiosis. Cada 2 semanas 10 µl del inóculo eran evaluados al microscopio de campo oscuro en busca de crecimiento de *Leptospira*. Las muestras que no presentaron crecimiento al cabo de las 16 semanas se consideraron negativas. Las muestras que presentaban estructuras compatibles con hongos contaminantes, tanto macro como microscópicamente, fueron descartadas como contaminadas.

6.4.3. Identificación y cuantificación de leptospiras patógenas mediante qPCR *lipL32*

6.4.3.1. Obtención de ADN a partir de muestras de orina

Se utilizaron aproximadamente 12 ml de las mismas muestras de orina que fueron usadas para el aislamiento microbiológico. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento pre-extracción de ADN. Se midió el pH de la muestra (usualmente entre 5.5 y 6.5) y se le agregó de 3 a 5 gotas de NaOH 2.5 M para aproximar el pH a 7. Se centrifugó a 4000 x g por 30 minutos a 6°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 µl de PBS 1X. Las muestras se almacenaron a -20°C y al final del muestreo fueron enviadas al LID-UPCH en cadena de frío, para su procesamiento.

Al llegar a su destino, las muestras fueron lavadas con 500 μ l de PBS 1X y centrifugadas a 13 000 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido fue utilizado para la extracción de ADN. Se utilizó el kit comercial “*GeneJET Genomic DNA Purification Kit*” (Thermo Fisher Scientific) para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Solo se modificó la elución para maximizar la concentración de ADN, en lugar de utilizar 200 μ l se utilizaron 150 μ l de buffer de elución. Se utilizaron controles de contaminación durante la extracción de ADN. Estos controles fueron sometidos a la qPCR junto con las muestras problema, con el objetivo de detectar cualquier contaminación cruzada durante el proceso de extracción.

6.4.3.2. Análisis de calidad de muestras de ADN

Por considerarse la orina una matriz complicada para la extracción de ADN y posterior análisis por métodos moleculares, se realizó un control de calidad de cada muestra extraída que consistía en: evaluación de pureza, integridad, concentración y funcionalidad. Así se descartó que existiese algún falso negativo en los análisis moleculares posteriores, debido a una mala calidad de ADN.

Para evaluar la pureza de las muestras se obtuvo el ratio 260/280 mediante mediciones de 1 μ l de muestra por triplicado en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), considerando admisible un ratio entre 1.6 y 2. La integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, considerándose admisibles las muestras que presentaban una única banda sólida sin degradación o “*smear*”. La concentración de ADN fue medida por fluorometría en Qubit 1.0 (Invitrogen, EEUU) y se consideraron admisibles las muestras por encima del límite de detección del kit (>0.05 ng/ μ l). La funcionalidad del ADN extraído se

evaluó mediante una PCR en tiempo real para el gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) tanto de perro como de cerdo (Tabla 4), considerándose una muestra con calidad y cantidad suficiente para ser sometida a PCR, aquella que tuviera amplificación para este marcador con la T_m esperada entre 78.5-80°C para perros y 83-84°C para cerdos.

Tabla 4. Condiciones de PCR en tiempo real GAPDH

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 seg	} 45
Hibridación	60°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Curva de Melting	65 – 95 °C	Incremento de 0.5 °C cada 5 Segundos	

6.4.3.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) del gen *Lipl32*

Todas las muestras de ADN extraídas a partir de orina fueron sometidas a una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en el termociclador CFX96 Touch ® Real-Time PCR (Bio-Rad). Se amplificó un fragmento de 241 bp del gen *Lipl32* (Figura 9), que codifica para la lipoproteína 32 de membrana, conocida también como Hap1 y presente solo en leptospiras patógenas (61). El protocolo fue desarrollado por el grupo de investigación en la Universidad de California, San Diego (Matthias *et al.*, manuscrito en preparación).

Se utilizaron los cebadores “Lipl32_178 forward” (5'-TCTGTGATCAACTATTACGGATAC -3') y “Lipl32_419 reverse” (5'-ATCCAAGTATCAAACCAATGTGG -3'), bajo las condiciones detalladas en la

Tabla 5. La reacción consistió en 1X de “master mix” PerfeCTa SYBR® Green FastMix (Quanta bio), 0,4 µM de cebadores, 5 µl de ADN y agua libre de DNAsas y RNAsas hasta un volumen final de 20 µl.

Tabla 5. Condiciones de qPCR *Lipl32*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	} 45
Hibridación	62°C	30 seg	
Curva de Melting	65 – 95 °C	Incremento de 0.5 °C cada 5 Segundos	

Cada muestra se corrió por triplicado y se consideró positivo cuando las 3 réplicas tuvieron amplificación. Cuando solo 2 réplicas amplificaban, el ensayo era repetido. Se utilizaron los siguientes controles: Control negativo (ADN de la cepa saprofita *Leptospira biflexa*), control de esterilidad (agua libre de DNAsa, RNAsa), control positivo (ADN de la cepa patógena *L. interrogans* serovar Copenhageni), control de extracción de ADN (obtenido con cada extracción de un lote de muestras de orina).

Para realizar la cuantificación de copias de genoma de *Leptospira* por reacción en las muestras problema, se obtuvo una curva estándar con 7 diluciones de ADN de *L. interrogans* serovar Copenhageni desde 1×10^6 hasta 1×10^0 copias genoma/reacción. Mediante la regresión lineal de N° copias genoma/reacción vs Cq de la curva estándar se obtuvo una ecuación de la recta para obtener el SQ o N° copias genoma/reacción de las muestras problema. Además, se obtuvo el R² y eficiencia de cada ensayo de PCR.

Las muestras positivas fueron verificadas mediante sus resultados en la curva de *melting* incluida en el protocolo de PCR (T_m esperada entre 80.5 - 81.5°C) o mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% cuando era necesario. Adicionalmente, se repitieron independientemente los qPCR de las muestras positivas en una fecha distinta para corroborar su positividad (datos no mostrados).

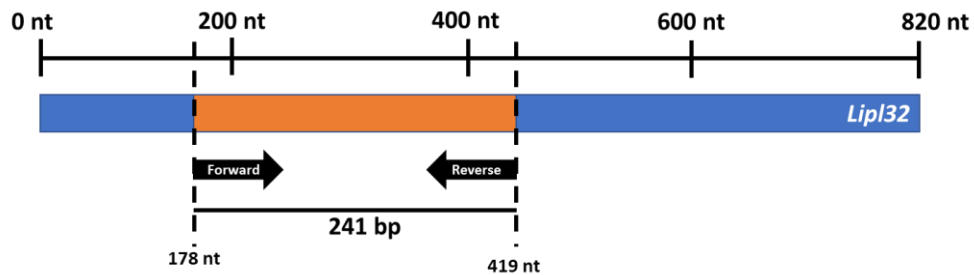


Figura 9. Posición de los cebadores de la qPCR *LipI32*

6.4.4. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de especie mediante gen *rrs* (16S)

6.4.4.1. PCR convencional del gen *rrs* (16S)

Para identificar la especie de las muestras positivas a leptospiras patógenas, estas fueron sometidas a una PCR convencional en el termociclador T100® (Bio-Rad, EEUU). Se amplificó una región hipervariable de 331 bp del gen *rrs* (16S) presente en el género *Leptospira* (Figura 10), la cual codifica para el ARN ribosomal 16S del ribosoma bacteriano, descrito anteriormente (62).

El protocolo original fue adaptado con diferente temperatura de hibridación y concentración de cebadores, optimizados para el presente trabajo de investigación. Se utilizaron los cebadores Lepto_16S_LA (5' – GGCGGCGCGTCTTAAACATG – 3') y Lepto_16S_LB (5' –

TTCCCCCATTGAGCAAGATT – 3’) bajo las condiciones detalladas en la Tabla 6. La reacción consistió en 1X de “Master mix” HotStarTaq® (Qiagen, EEUU), 0.5 µM de cebadores, 5 µl de ADN y agua libre de DNAsa y RNAsa hasta un volumen final de 50 µl.

Tabla 6. Condiciones de PCR *rrs*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	15 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	} 30
Hibridación	54°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Se utilizaron los siguientes controles: Control negativo (mezcla de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas filogenéticamente no relacionadas), control de esterilidad (agua libre de DNAsa, RNAsa) y control positivo (ADN de *L. interrogans* serovar Copenhageni).

Las muestras se procesaron por duplicado, los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras que no presentaron una banda visible fueron sometidas a una segunda ronda de PCR, utilizando cebadores inmediatamente internos al primer par de cebadores para amplificar una región de 289 bp (Figura 10), Lepto_16S_LC (5’ – CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA – 3’) y Lepto_16S_LD (5’ – CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA – 3’) (62). Se utilizaron 5 µl del producto de la primera ronda y las mismas condiciones detalladas en la tabla 6. Asimismo, se utilizaron controles de esterilidad, tanto de la primera ronda de PCR como para la

segunda ronda (agua libre de DNAsa, RNAsa), para garantizar que no exista contaminación cruzada por productos de la primera ronda de PCR.

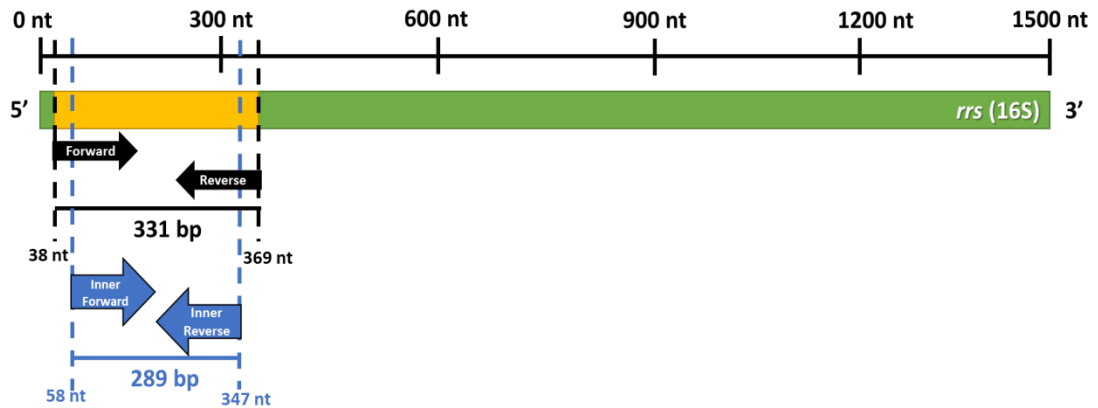


Figura 10. Posición de los cebadores de la PCR *rrs* (16S)

6.4.4.2. Sensibilidad y especificidad analítica de la PCR *rrs*

Dada la matriz, orina de perro y cerdo, utilizada en el presente trabajo y no reportada anteriormente, se tuvo que precisar la sensibilidad y especificidad analítica del protocolo. Para determinar la sensibilidad de la PCR se utilizó orina de perro y cerdo saludables (negativos a qPCR *Lipl32*), inoculados con *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, en diluciones seriadas de 5×10^6 hasta 5×10^0 bacterias/ml. La bacteria fue incubada hasta su fase logarítmica, determinada por conteo en la cámara Petroff Hausser y diluida en 12 ml de orina, tanto de perro como de cerdo. Se siguió el mismo proceso de tratamiento pre-extracción y extracción de ADN utilizado para las muestras problema (detallado en el numeral 6.4.3.1).

Para determinar la especificidad de la PCR se utilizaron ADN de las 21 cepas referencia (Tabla 3) y ADN de bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus pseudintermedius*) y Gram negativas (*Salmonella*

enterica y *Escherichia coli*) filogenéticamente no relacionadas. Asimismo, se utilizó ADN de orina de perro y cerdo no infectados por *Leptospira* (negativos a qPCR *Lipl32*), extraído bajo el protocolo detallado en el numeral 6.4.3.1. Además de agua libre de DNAsa y RNAsa como control de esterilidad.

6.4.4.3. Secuenciación y análisis de secuencias *rrs*

Tras la PCR de las muestras problema, los productos obtenidos en la primera ronda de PCR fueron purificados directamente del tubo de reacción mediante el Kit “*GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit*” (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mientras que los productos obtenidos en la segunda ronda de PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa al 2%, utilizando el mismo Kit bajo distinto protocolo.

Una vez purificados, los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación bidireccional mediante el método de Sanger a Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas como resultado fueron procesadas y analizadas utilizando el software libre MEGA 7.0 (63). Los electroferogramas fueron “limpiados” manualmente y se obtuvo una secuencia consenso por alineamiento e inspección visual de las secuencias 5’-3’ y 3’-5’, para cada muestra problema secuenciada.

Por otro lado, se descargaron las secuencias referencia para el gen *rrs* de las 22 especies del género *Leptospira* disponibles en *GenBank* (repositorio libre del NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – de EEUU), se recortó el fragmento hipervariable de 331 bp para cada secuencia. Se realizó un alineamiento múltiple mediante el método “*ClustalW*” con parámetros por defecto, utilizando las

secuencias *rrs* referencia y las secuencias *rrs* de las muestras problema. Posteriormente se obtuvo un árbol filogenético mediante el método *Neighbor Joining Tree* con 1000 bootstraps, identificándose así las especies a las que estaban más relacionadas las muestras problema.

6.4.5. Estandarización del protocolo de PCR-HRM para la identificación de *Leptospira* patógenas a nivel de serovar

6.4.5.1. PCR-HRM del gen *rfbX*

Un novedoso protocolo para la tipificación molecular de *Leptospira* a nivel de serovar fue desarrollado por el grupo de investigación en la Universidad de California, San Diego (UCSD) (Lubar *et al.*, manuscrito en preparación). El protocolo estaba dirigido a la tipificación independiente de cultivo de los serovares pertenecientes a las 6 especies de *Leptospira* de mayor relevancia clínica a nivel mundial: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*. El diseño se hizo bajo la hipótesis de que la heterogeneidad antigénica del antígeno O del LPS tiene bases moleculares en los polimorfismos presentes en el gen *rfbX*, detectables por una fina fluctuación de la temperatura de *melting* en una secuencia hipervariable de este gen. Por tal motivo, el grupo diseñó 3 pares de cebadores dirigidos a amplificar una región hipervariable de 265 bp del gen *rfbX* que codifica para la translocasa del antígeno O, dentro del operon *rfb* encargado de la biosíntesis del antígeno O del LPS de *Leptospira* (Figura 11). El alineamiento fue guiado por aminoácidos usando 454 secuencias del gen *rfbX* del género *Leptospira*, disponibles en el Genbank. El protocolo fue estandarizado utilizando ADN de un panel de serovares patogénicos de *Leptospira* (Lubar *et al.*, manuscrito en preparación).

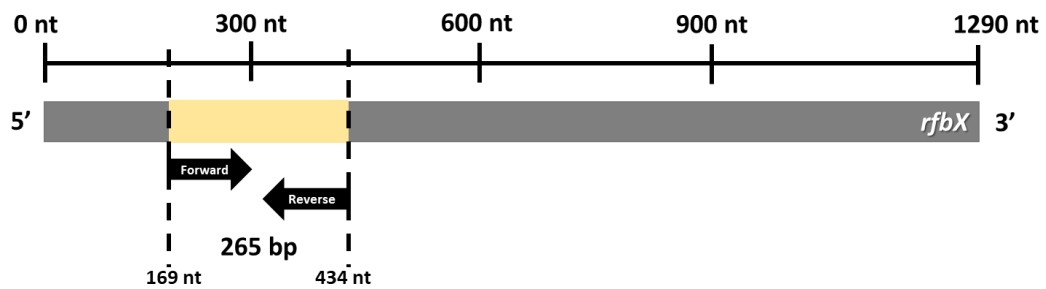


Figura 11. Posición de los cebadores de la PCR-HRM *rfbX*

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por el grupo de investigación en UCSD, se realizó la PCR en tiempo real en el termociclador CFX96 Touch® Real-Time PCR (Bio-Rad), siguiendo las condiciones optimizadas (Tabla 7). Se utilizaron los 3 pares de cebadores especie específicos. Para *Leptospira interrogans*, *kirschneri* y *noguchii* se utilizaron los cebadores *rfbX_YC* (5' -AACGGACTTTTTCAATACTACGC- 3') y *rfbx_RAVGX* (5' -TTAAAGGAAAGTATAAACTTCCTAAC- 3'). Para *Leptospira santarosai* y *weilii* los cebadores *rfbX_YT* (5' -AACGGACTTTTTCAATACTATGC- 3') y *rfbX_RGVC* (5' -TTGAACGAAAGTATAAACTTCC- 3'). Para *Leptospira borgpetersenii* los cebadores *rfbX_YTT* (5' -AACGGACTTTTTCATTATTATGC- 3') y *rfbX_RGVTG* (5' -TTGAATGAGAGTATAAACTTCCC- 3'). La reacción consistió en 1X de "Precision Melt Supermix" (Bio-Rad), que incluye al fluoroforo saturante *EvaGreen* necesario para el *melting* de alta resolución, 0.4 µM de los 3 pares de cebadores, 2 µl de ADN y agua libre de DNAsa y RNAsa hasta un volumen final de 20 µl.

Se utilizaron 19 serovares patógenos de referencia (Tabla 3), que están incluidos dentro de las 6 especies amplificadas por los cebadores diseñados por el

grupo de UCSD. Dado que no se esperaba una buena concentración de ADN de las muestras de orina, el ADN de los 19 serovares de referencia se utilizó a una concentración de 1 ng/reacción, la mínima detectable por el “*Precision Melt Supermix*” (Bio-Rad). Cada reacción se realizó por triplicado en la misma placa. Se considero una correcta amplificación cuando las 3 réplicas obtenían una temperatura de *melting* dentro de lo esperado ($T_m = 80-85\text{ }^\circ\text{C}$) y mostraban una única banda de 265 bp en la electroforesis de gel de agarosa al 2%. Se utilizaron los siguientes controles: Control negativo (el serovar saprofito *L. biflexa* y el serovar patógeno intermedio *L. licerasiae*) y control de esterilidad (agua libre de DNAsa, RNAsa).

Tabla 7. Condiciones de PCR-HRM del gen *rfbX*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Denaturacion inicial	95°C	3 min	1
Denaturacion	95°C	1 min	} 45
Hibridación	62°C	30 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1
Análisis de Melting	75 – 95 °C	Incremento de 0.2°C cada 10 segundos	

6.4.5.2. Análisis de *melting* de alta resolución (HRM)

Se analizaron los resultados de la PCR-HRM usando el software Precision Melt Analysis TM (Bio-Rad) con los parámetros programados por defecto para obtener un nivel de confianza aceptable en la clasificación de los *clusters*: “*Melt curve shape sensitivity*” al 50%, “*Tm difference threshold*” en 0.15°C y

“*Temperature bar shift height*” a 0.2. Asimismo, la región de *melting* para el análisis fue detectada automáticamente por el software. De esta manera cada cepa de referencia fue agrupada en un “*cluster*” o categoría de acuerdo al perfil de *melting* de sus amplicones con una confianza determinada por la desviación estándar de las curvas de *melting* dentro del mismo *cluster*. El valor de confianza es un indicador de la probabilidad relativa que tiene la muestra de estar en un *cluster* o categoría.

Para la clasificación en *cluster* o categorías, el software elige entre todos los perfiles de los pocillos el perfil de *melting* que más se repite y lo toma como perfil de referencia. Luego diferencia y ubica al resto de perfiles en categorías de acuerdo al grado de similitud que tengan con este perfil de referencia. Para tal fin se normaliza la región de *melting* de todos los perfiles con el valor de 1 (al iniciar el *melting*) hasta 0 (al terminar el *melting*), de manera que las diferencias entre los perfiles se hacen más notorias. Finalmente, se convierte este gráfico a un gráfico “*Difference curve*”, donde se observa el perfil de referencia como línea base y los perfiles con crestas por encima del perfil referencia son las que tienen mayor contenido de GC, mientras que los perfiles con valles por debajo del perfil referencia son las que tiene menor contenido de GC.

6.4.5.3. Sensibilidad y especificidad analítica de la PCR-HRM

De acuerdo a los criterios para la estandarización del protocolo de PCR en la matriz utilizada en el presente estudio, se halló la sensibilidad y especificidad analítica. Para determinar la sensibilidad analítica o límite de detección (LOD por sus siglas en inglés) en orina de perro y cerdo, se hicieron diluciones seriadas de 5×10^6 hasta 5×10^0 bacterias/ml de orina de perro y cerdos saludables (negativos a

qPCR de *Lipl32*). Para obtener la sensibilidad de cada uno de los 3 pares de cebadores por separado, las diluciones se realizaron con un serovar representativo de la especie para la cual el cebador estaba diseñado. Con *L. interrogans* serovar Copenhageni para el par de cebadores rfbX_YC y rfbx_RAVGX. Con *L. santarosai* serovar Georgia para el par de cebadores rfbX_YT y rfbX_RGVC. Con *L. borgpetersenii* serovar Ballum para el par de cebadores rfbX_YTT y rfbX_RGVTG. Las bacterias fueron inoculadas en su fase logarítmica, determinada por conteo en la cámara Petroff Hausser y diluidas en 12 ml de orina, tanto de perro como de cerdo. Se siguió el mismo proceso de tratamiento pre-extracción y extracción de ADN utilizado para las muestras problema (detallado en el numeral 6.4.3.1).

El punto de corte para determinar la última dilución amplificable fue un Cq < 40 con una Tm esperada de acuerdo a la especie. Se utilizaron control negativo (ADN de la cepa saprofita *Leptospira biflexa*) y control de esterilidad (agua libre de DNAsa, RNAsa).

Se determinó la especificidad y reacción cruzada inter-especie en cada par de cebadores por separado, realizando una PCR-HRM para cada uno. Se utilizaron en cada caso, ADN de los 19 serovares patógenos de referencia (Tabla 3) a la concentración de 1 ng/reaccion. Como control negativo de especie se utilizaron ADN de dos especies cercanas, el serovar saprofita *L. biflexa* serovar patoc y el serovar patógeno intermedio *L. licerasiae* serovar Varillal; asimismo ADN de especies lejanas, filogenéticamente no relacionadas, una mezcla de bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus pseudintermedius*) y Gram negativas (*Salmonella enterica* y *Escherichia coli*). Finalmente, como control de

esterilidad se utilizó agua libre de DNAsa y RNAsa. Todas las reacciones tuvieron 3 réplicas técnicas en el mismo ensayo PCR.

6.4.5.4. Eficiencia de tipificación y poder discriminatorio

La eficiencia de tipificación para el marcador *rfbX* se evaluó mediante la siguiente fórmula:

$$T = Nt/N \times 100$$

(Donde Nt es el número de cepas referencia que obtuvieron amplificación y N es el número de cepas utilizadas).

El poder discriminatorio se refiere a la capacidad de asignar diferente genotipo a dos bacterias que no están relacionadas. Se evaluó mediante el Índice de Diversidad de Simpson (64), según la siguiente formula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1),$$

(Donde N es el número total de cepas utilizadas, S es el número total de grupos o *clusters* clasificados mediante la PCR-HRM y n_j es el número de cepas pertenecientes al grupo o *cluster* “ j ”)

6.4.5.5. Reproducibilidad de la PCR

Se repitió 5 veces el ensayo de la PCR-HRM de manera independiente, utilizando los 3 pares de cebadores juntos y ADN de los 18 serovares patógenos de referencia (Tabla 3) a 1 ng/reacción, para observar si existía variación inter-ensayo tanto en T_m como en la clasificación en “*clusters*” de acuerdo al análisis HRM.

6.4.6. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de serovar

Para identificar el serovar al que pertenecían las muestras positivas a leptospiras patógenas, estas fueron sometidas a la PCR-HRM en el termociclador CFX96 Touch ® Real-Time PCR (Bio-Rad) bajo condiciones estandarizadas, tal y como se detalla en el numeral 6.4.5.1.

Todas las reacciones se realizaron por triplicado en la misma placa. Se considero una correcta amplificación cuando las 3 réplicas obtenían una temperatura de *melting* dentro de lo esperado ($T_m = 80-85\text{ °C}$). Se utilizaron los siguientes controles: Control negativo (*L. biflexa* y *L. licerasiae*), control de esterilidad (agua libre de DNAsa, RNAsa) y control positivo de cada una de las cepas representantes de las 6 especies (ADN de *L. interrogans* serovar Copenhageni, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa, *L. noguchii* serovar Panama, *L. weilii* serovar Celledoni, *L. santarosai* serovar Georgia y *L. borgpetersenii* serovar Ballum). Para el analisis *melting* de alta resolución se utilizó el software Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad).

6.5. CONSIDERACIONES ETICAS

El presente trabajo de investigación inscrito bajo el código SIDISI 102253, cuenta con aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con constancia N° 015-05-18. La colección de muestra se realizó bajo la aprobación ética del CIEA del proyecto matriz “Rol de los animales domésticos en transmisión de leptospirosis y bacterias resistentes a antibióticos en Iquitos” (SIDISI: 63691).

6.6. PLAN DE ANÁLISIS

Todos los datos obtenidos fueron procesados mediante el software STATA 13 (StataCorp LLC, TX). Los resultados obtenidos de cerdos y perros positivos para las distintas especies patógenas de *Leptospira* se ingresaron en una tabla de contingencia, con el tipo de reservorio en filas (variable dependiente) y las especies de *Leptospira* a las que fueron positivos en columnas (variable independiente). Se realizó el test exacto de Fisher para evaluar la asociación estadística significativa ($p < 0.05$) entre al menos una especie patógena de *Leptospira* y su reservorio doméstico. Además, por el mismo test, se evaluó la asociación entre la especie de *Leptospira* más frecuente y el reservorio que la excretaba.

Por otro lado, también con STATA 13 (StataCorp LLC, TX), se evaluó la asociación de la excreción de leptospiras patógenas en orina (leptospiuria) con el tipo de reservorio, mediante un test exacto de Fisher ($p < 0.05$). Además, se compararon las medias de los \log_{10} de los niveles de excreción de *Leptospira* (leptospiuria) de ambos reservorios, mediante un T de Student, para determinar si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Asimismo, se compararon las medias de los \log_{10} de los niveles en que era excretada cada especie de *Leptospira*, mediante un ANOVA, para evaluar también la significancia estadística de sus diferencias ($p < 0.05$).

VII. RESULTADOS

7.1. Identificación de leptospiras patógenas mediante cultivo microbiológico

Se intentó el aislamiento con 127 muestras de orina de perro, y 123 de orina y 161 de riñón de cerdo. No se obtuvieron aislamientos positivos en ninguna muestra. El 46% (57/127) de muestras de orina de perro resultaron contaminadas con estructuras micro y macroscópicas compatibles con hongos. El 54 % (70/127) restante se consideró negativa al no observar crecimiento al cabo de 16 semanas. Mientras que, en las muestras de orina de cerdo, 36% (44/123) resultaron contaminadas y 64% (79/123) negativas, y las muestras de riñón, 12% (19/161) contaminadas y 88% (142/161) negativas.

7.2. Identificación y cuantificación de leptospiras patógenas mediante qPCR

Lipl32

7.2.1. Análisis de calidad de ADN a partir de muestras de orina

Se analizó la calidad de ADN proveniente de 127 muestras de orina de perro y 123 de cerdo. Para los parámetros de calidad de ADN de las muestras de perro, 31% (39/127) fueron consideradas muestras puras, 15% (19/127) muestras integrales, 36% (46/127) pudieron ser cuantificadas mediante Qubit, con una concentración promedio de 0.38 ng/μl (Min= 0.06 ng/μl; Max= 4.39 ng/μl) y 100% (127/127) presentó ADN amplificable al PCR en tiempo real de GAPDH canino (Anexo 1). Sin considerar el criterio de ADN amplificable, 6.3% (8/127) muestras cumplieron los tres primeros criterios simultáneamente (Figura 12).

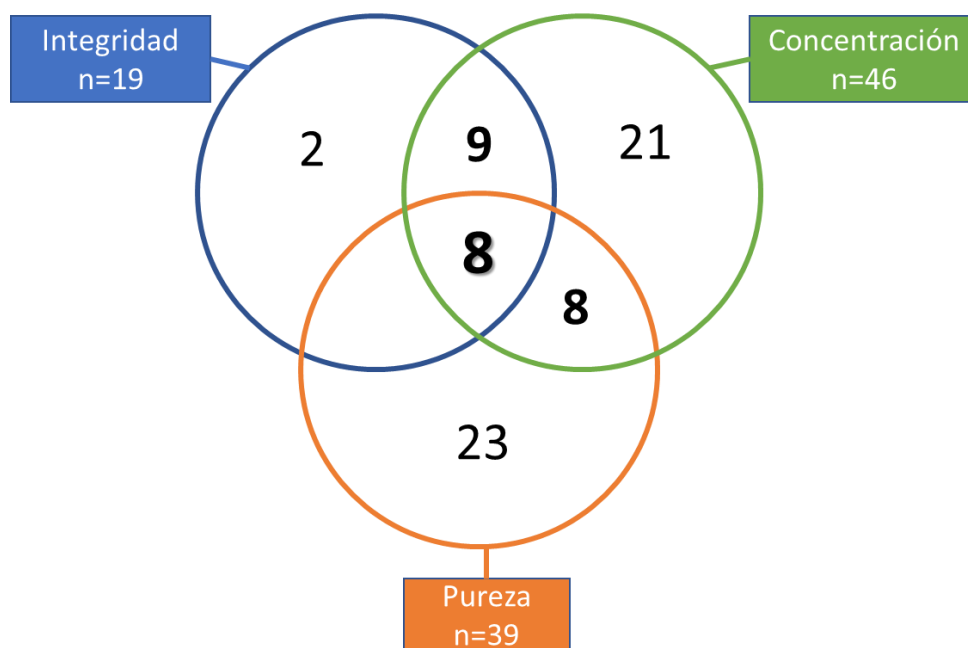


Figura 12. Control de calidad de las muestras de ADN de perro. Número de muestras aptas para cada criterio de calidad

Mientras que, para las muestras de cerdo, 44% (54/123) fueron consideradas muestras puras, 54% (67/123) integra, 89% (110/123) pudieron ser cuantificadas por Qubit, con una concentración de ADN promedio de 2.67 ng/μl (Min= 0.06 ng/μl; Max= 36.4 ng/μl) y 100% (123/123) presento ADN amplificable al PCR en tiempo real de GAPDH porcino (Anexo 2). Sin considerar el criterio de ADN amplificable, 29.3% (36/123) muestras cumplieron los tres primeros criterios simultáneamente (Figura 13).

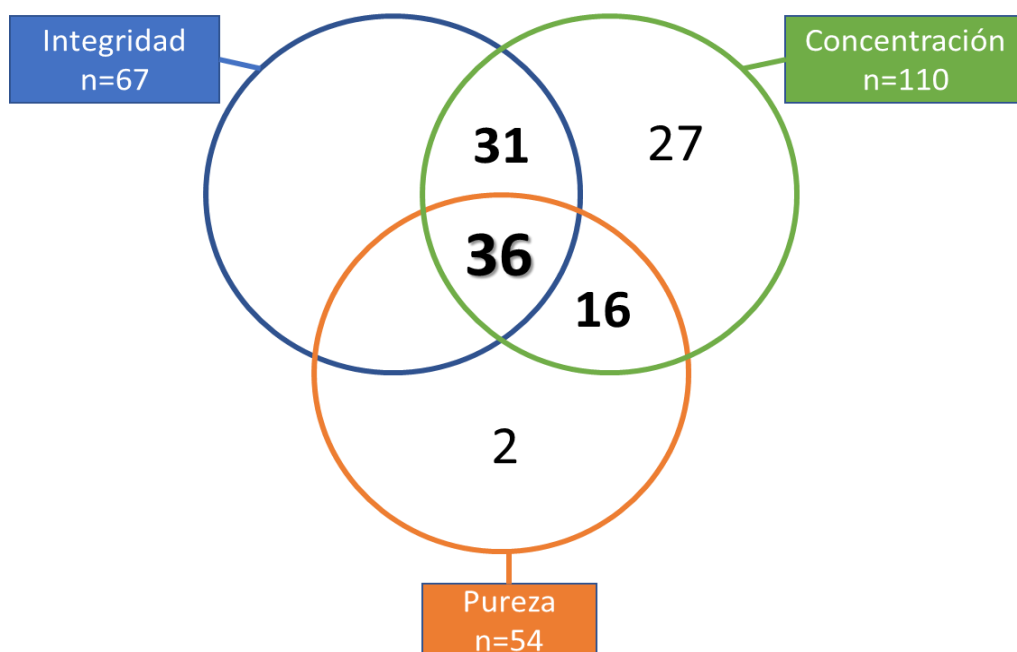


Figura 13. Control de calidad de las muestras de ADN de cerdo. Número de muestras aptas para cada criterio de calidad

7.2.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) del gen *Lipl32*

En las muestras de orina de perro se obtuvo el 15% (19/127), IC95% (9% – 21%), de muestras positivas para qPCR *Lipl32* (Tabla 8), mientras que en las de cerdo se obtuvo el 9.8% (12/123), IC95% (4.8% - 14.8%), positivas para el mismo ensayo (Tabla 9).

Para la cuantificación de niveles de ADN bacteriano en las muestras de orina (leptospiuria), en perros se obtuvo un promedio de 4.49 E+02 copias genoma/reacción, IC95% (-3.49 E+02 – 1.25 E+03), con una Eficiencia promedio de 83.3% y un R² promedio de 0.98. Mientras que en cerdos se obtuvo un promedio de 2.90 E+00 copias genoma/reacción, IC95% (2.87 E-02 – 5.77 E+00), con una Eficiencia promedio de 89.3% y un R² promedio de 0.99.

Tabla 8. Muestras de orina de perro positivas a qPCR *LipI32*

Código	Cq^a	SQ (cop/rx)^a	Tm (°C)	E (%)	R²
LB/P-09	37.85	2.36 E+01	81.5	93	0.98
LB/P-27	40.39	2.33 E-01	81.5	80.4	0.99
LB/P-30	35.85	3.24 E+00	81	80.4	0.99
LB/P-35	35.50	1.10 E+02	81.5	93	0.98
LB/P-39	33.14	4.21 E+02	81.5	93	0.98
LB/P-41	39.89	3.64 E+00	81.5	73.6	0.97
LB/P-48	40.23	1.23 E+00	81.5	74.8	0.98
LB/P-69	34.49	1.11 E+01	81	83.9	0.99
LB/P-70	40.33	3.86 E-01	81	83.9	0.99
LB/P-79	35.51	9.22 E+00	81.5	86.3	0.99
LB/P-85	36.41	5.17 E+00	81	86.3	0.99
LB/P-105	31.05	1.62 E+02	81	80.8	0.99
LB/P-144	31.29	3.94 E+02	81.5	74.8	0.98
LB/P-148	24.63	7.27 E+03	81.5	80.8	0.99
LB/P-149	38.65	1.81 E+00	81.5	80.8	0.99
LB/P-151	40.84	1.92 E+00	81.5	74.8	0.98
LB/P-171	32.24	3.27 E+01	81.5	87.6	0.99
LB/P-172	35.68	3.88 E+00	81.5	87.6	0.99
LB/P-173	30.87	8.00 E+01	81.5	87.6	0.99

^a Se muestran los resultados promediados de las 3 réplicas técnicas

Cq: Ciclo umbral (Cycle quantification)

SQ: Cantidad o concentración inicial (Starting quantity)

E: Eficiencia de reacción

R²: Coeficiente de determinación

Tabla 9. Muestras de orina de cerdo positivas a qPCR *Lipl32*

Código	Cq^a	SQ (cop/rx)^a	Tm (°C)	E (%)	R²
LB/C-81	37.09	1.57 E+00	81	88.8	0.99
LB/C-95	33.97	1.13 E+01	80.5	88.8	0.99
LB/C-114	36.19	2.80 E+00	81	88.8	0.99
LB/C-118	33.97	2.01 E+00	81.5	87.6	0.99
LB/C-123	33.77	1.34 E+01	81	88.8	0.99
LB/C-129	37.93	9.81 E-01	81	88.8	0.99
LB/C-147	38.16	7.89 E-01	81.5	88.8	0.99
LB/C-149	36.03	5.61 E-01	81	87.6	0.99
LB/C-158	39.30	3.93 E-02	81.5	87.6	0.99
LB/C-172	37.55	1.30 E+00	81	88.8	0.99
LB/C-173	38.57	1.06 E-02	81	93.6	0.99
LB/C-184	37.78	2.31 E-02	81.5	93.6	0.99

^a Se muestran los resultados promediados de las 3 réplicas técnicas

Cq: Ciclo umbral (Cycle quantification)

SQ: Cantidad o concentración inicial (Starting quantity)

E: Eficiencia de reacción

R²: Coeficiente de determinación

El análisis de asociación entre la leptospiruria (qPCR *Lipl32* positivos) y el tipo de hospedero (Tabla 10) no encontró que estas variables se asocien ($p = 0.21$). Por otro lado, debido a que los resultados de niveles de leptospiruria de ambos hospederos no seguían una distribución normal y presentaban muchos valores atípicos (*Outliers*), se convirtieron a logaritmo en base 10. De esta manera su distribución se normalizó y se facilitó el análisis estadístico. Las diferencias encontradas entre la media del \log_{10} del nivel de leptospiruria en perro 1.16, IC 95% (0.61 – 1.72) y el de cerdo -0.18, IC 95% (-0.83 – 0.46), fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0024$) (Figura 14).

Tabla 10. Muestras positivas a qPCR *Lipl32* según tipo de reservorio

		qPCR <i>Lipl32</i> (n(%))		p*
		Positivos	Negativo	
Tipo de reservorio	Perros (n=127)	19 (15.0)	108 (85.0)	0.21
	Cerdos (n=123)	12 (9.8)	111 (90.2)	

* Valor de p del Test exacto de Fisher

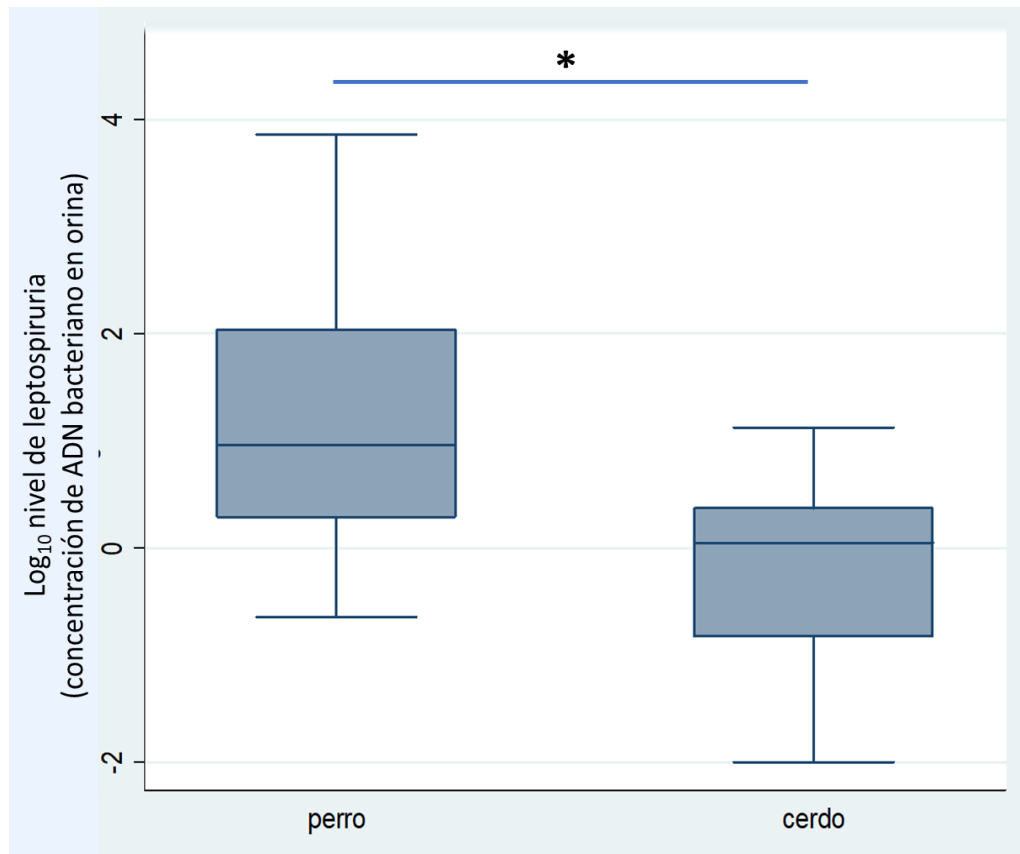


Figura 14. Diferencias entre el Log₁₀ de nivel de leptospiruria de perro y cerdo. Gráfico de Caja y bigote (Línea central, mediana; Límites de la caja, Rango intercuartil (IQR); Bigotes, 1.5 x IQR) de los niveles de excreción de leptospiras patógenas en perros (n=19) y cerdos (n=12). T de Student, * p < 0.05

7.3. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de especie

7.3.1. Sensibilidad y especificidad analítica de la PCR *rrs*

La sensibilidad analítica de la técnica en la primera ronda de PCR para orina de perro fue de 5×10^1 bacterias/ml de orina inoculada y en orina de cerdo 5×10^2 bacterias/ml de orina inoculada, el control de esterilidad no amplificó (Figura 15). En la segunda ronda de PCR se logró aumentar la sensibilidad de la técnica, pero a cambio se observaron bandas inespecíficas, sin embargo, los controles de esterilidad (1° y 2° ronda de PCR) no amplificaron. La sensibilidad analítica para orina de perro fue de 5×10^0 bacterias/ml y en orina de cerdo 5×10^1 bacterias/ml (Figura 16).

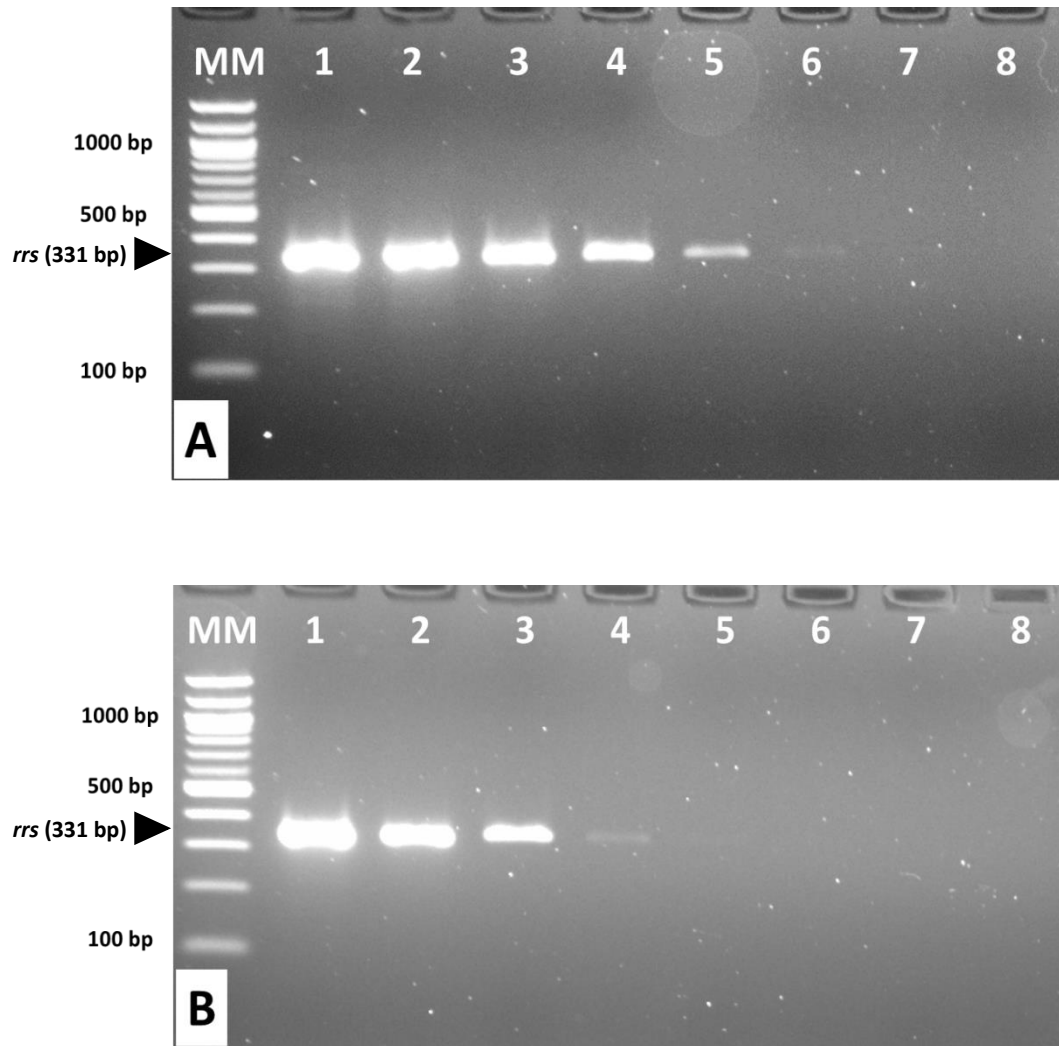


Figura 15. Sensibilidad analítica de primera ronda de PCR *rrs* (16S) en orina de Perro (A) y Cerdo (B). MM: Marcador molecular. Carril 1 al 7: Diluciones seriadas de 5×10^6 a 10^0 bact/ml. Carril 8: Control de esterilidad. Las flechas indican la posición aproximada del gen señalado.

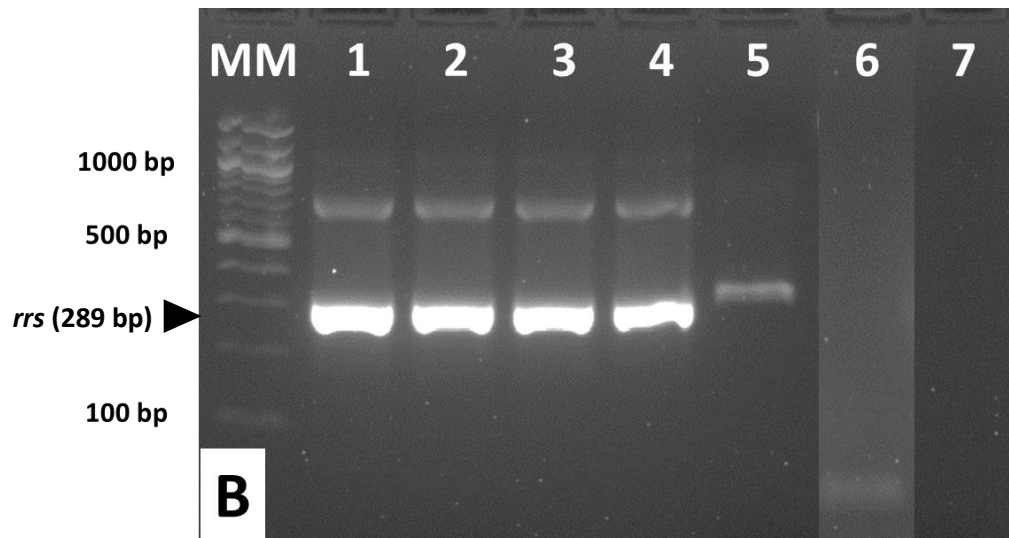
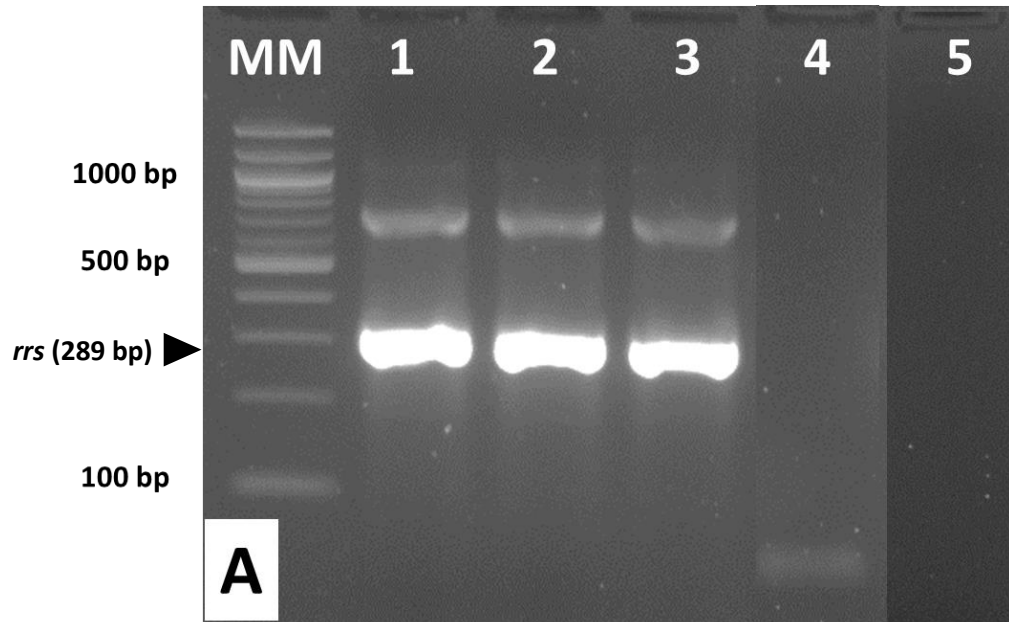


Figura 16. Sensibilidad analítica de segunda ronda de PCR *rrs* (16S) en orina de Perro (A), MM: Marcador molecular, Carril 1 al 3: Diluciones seriadas de 5×10^2 a 10^0 bact/ml, C4: Control de esterilidad de 1ra ronda PCR, C5: Control de esterilidad de 2da ronda PCR. Cerdo (B), Carril 1 al 5: Diluciones seriadas de 5×10^4 a 10^0 bact/ml. C6: Control de esterilidad de 1ra ronda PCR. C7: Control de esterilidad de 2da ronda PCR. Las flechas indican la posición aproximada del gen señalado.

En cuanto a la especificidad analítica, los cebadores mostraron ser específicos por el género *Leptospira* spp., amplificando los 21 serovares de referencia con una única banda de aproximadamente 331 bp, salvo la *Leptospira* saprofita *L. biflexa* serovar Patoc, que presentó dos bandas inespecíficas de aproximadamente 400 y 600 bp respectivamente. Los controles de esterilidad, de especie y controles negativos no amplificaron (Figura 17).

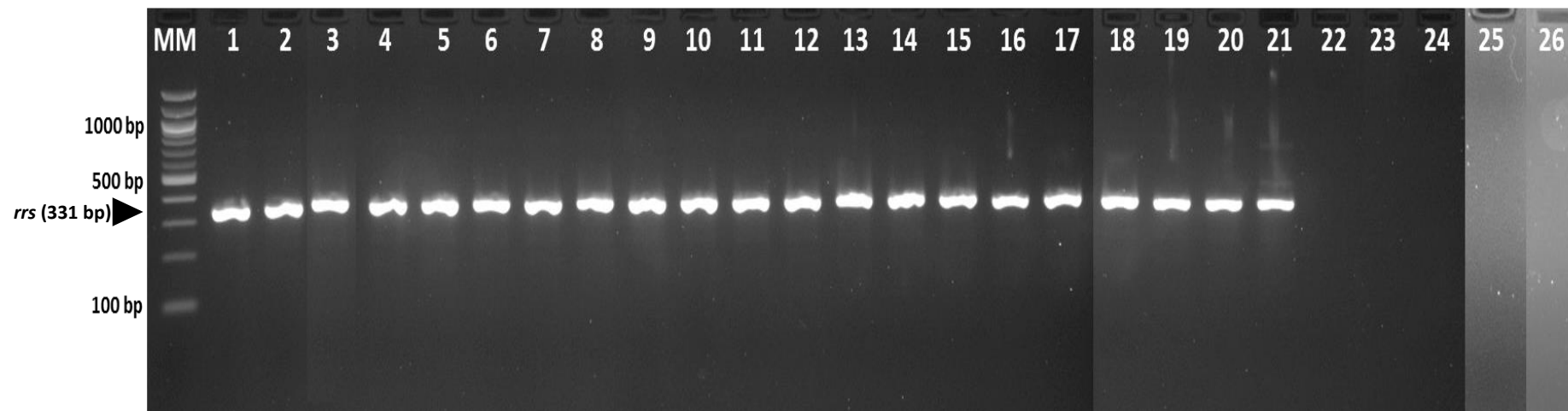


Figura 17. Especificidad analítica de la PCR *rrs* (16S). MM: Marcador molecular. Carril 1: *L. interrogans* serovar Australis. C2: *L. interrogans* sv Autumnalis. C3: *L. interrogans* sv Ballum. C4: *L. interrogans* sv Bataviae. C5: *L. interrogans* sv Bratislava. C6: *L. interrogans* sv Canicola. C7: *L. weilii* sv Celledoni. C8: *L. interrogans* sv Copenhageni. C9: *L. kirschneri* sv Cynopteri. C10: *L. interrogans* sv Djasiman. C11: *L. santarosai* sv Georgia. C12: *L. kirschneri* sv Gryppotyphosa. C13: *L. interrogans* sv Icterohaemorrhagiae. C14: *L. noguchii* sv Panama. C15: *L. borgpetersenii* sv Tarassovi. C16: *L. interrogans* sv Wolfii. C17: *L. interrogans* sv Mankarso. C18: *L. interrogans* sv Hardjo. C19: *L. interrogans* sv. Pyrogenes. C20: *L. licerasiae* sv Varillal. C21: *L. biflexa* sv Patoc. C22: Control de esterilidad (Agua libre de DNAsa y RNAsa). C23: Control de especie Gram (-) (*Salmonella enterica* y *Escherichia coli*). C24: Control de especie Gram (+) (*Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus pseudintermedius*). C25: Control negativo (ADN de orina de perro libre de *Leptospira*). C26: Control negativo (ADN de orina de cerdo libre de *Leptospira*). La flecha indica la posición aproximada del gen señalado.

7.3.2. PCR *rrs* de muestras positivas a leptospiras patógenas

De las 19 muestras de orina de perro positivas a *Lipl32*, 47.4% (9/19) lograron ser amplificadas en la primera ronda de PCR y el resto (10/19) en la segunda ronda (Figura 18). Mientras que, de las 12 muestras de cerdo, 33.3 % (4/12) fueron amplificadas en la primera ronda de PCR y el resto (8/12) en la segunda (Figura 19).

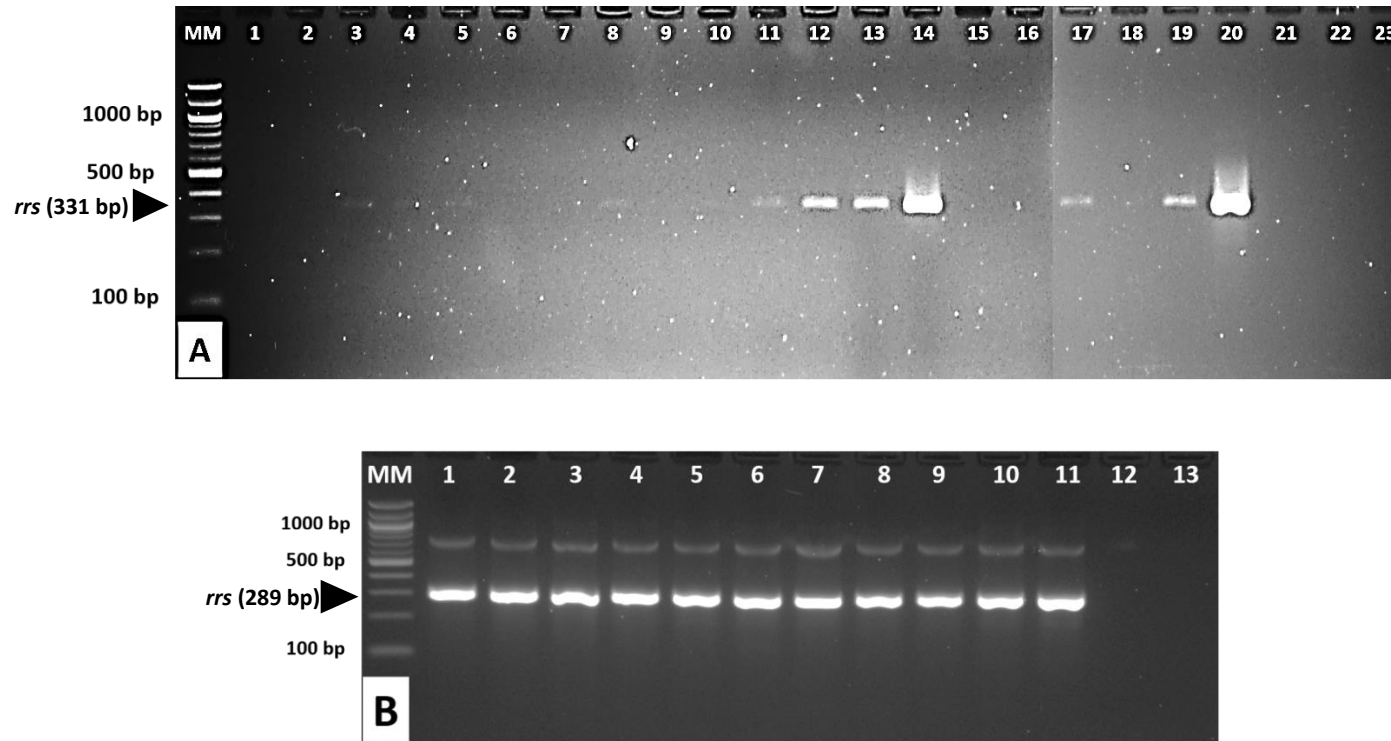


Figura 18. Resultados de PCR *rrs* de muestras de perro para la Primera ronda de PCR (A). MM: Marcador molecular. Carril 3, 5, 8, 11-14, 17 y 19: Muestras positivas, Carril 20: Control positivo (*L. interrogans* sv Copenhageni), C21: Control negativo Gram (+), C22: Control negativo Gram (-), C23: Control de esterilidad (agua libre de DNAsa y RNAsa). **Segunda ronda de PCR (B).** Carril 1-10: Muestras positivas. C11: Control positivo (*L. interrogans* sv Copenhageni). C12: Control negativo 1ra ronda PCR. C13: Control negativo 2da ronda PCR. Las flechas indican la posición aproximada del gen señalado.

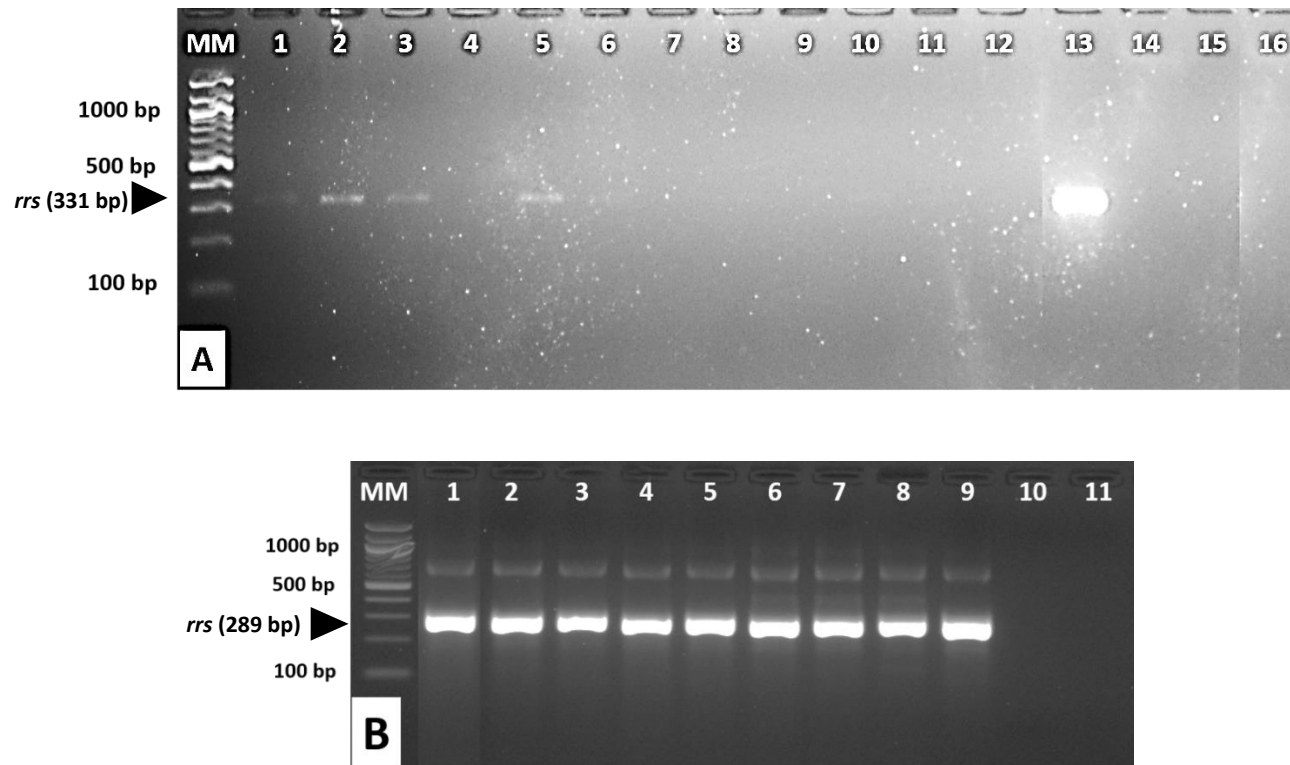


Figura 19. Resultados de PCR *rrs* de muestras de cerdo para la Primera ronda de PCR (A). MM: Marcador molecular. Carril 1, 2, 3 y 5: Muestras positivas. C 13: Control positivo (*L. interrogans* sv Copenhageni). C14: Control negativo Gram (+). C15: Control negativo Gram (-). C16: Control de esterilidad (agua libre de DNAsa y RNAsa). **Segunda ronda de PCR (B).** Carril 1-8: Muestras positivas. C9: Control positivo (*L. interrogans* sv Copenhageni). C10: Control negativo 1ra ronda PCR. C11: Control negativo 2da ronda PCR. Las flechas indican la posición aproximada del gen señalado.

7.3.3. Secuenciación y análisis de secuencias

Después de obtener las secuencias consenso para cada muestra mediante alineamiento e inspección visual de los electroferogramas de las secuencias 5'-3' y 3'-5' de cada muestra, se descartaron 3 secuencias de perros (LB/P-30, LB/P-69 y LB/P-172) y 2 secuencias de cerdos (LB/C-147 y LB/C-158) por presentar una mala calidad de secuenciación.

Por lo tanto, se realizó un alineamiento mediante ClustalW con 48 secuencias: 22 secuencias de referencia de cada especie de *Leptospira* (Genbank), 16 de muestras de orina perro y 10 de muestras de orina de cerdo. Se construyó un árbol filogenético con el método *Neighbor Joining Tree* y un remuestreo de 1000 *bootstraps* (Figura 20).

En el árbol filogenético, de las 16 muestras de orina de perro 56.2 % (9/16) se ubicaron relacionadas a la especie *L. interrogans*, 37.5% (6/16) a la especie *L. noguchii* y 6.3% (1/16) a la especie *L. santarosai*. Mientras que, de las 10 muestras de orina de cerdo, 30% (3/10) se ubicaron relacionadas a la especie *L. interrogans* y 70% (7/10) relacionadas a la especie *L. santarosai* (Figura 20).

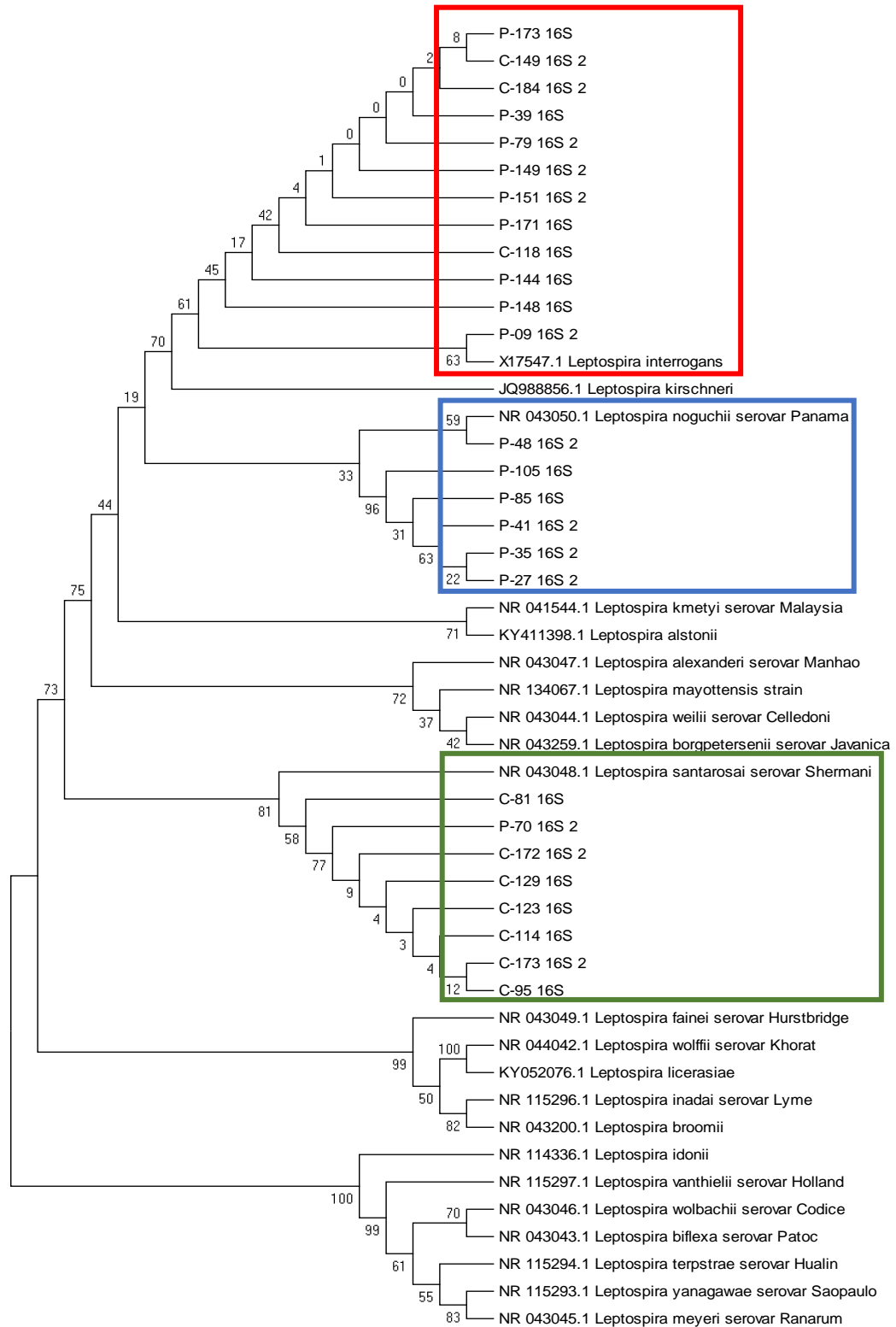


Figura 20. Árbol filogenético del marcador *rrs* de 16 muestras de perro, 10 de cerdo y secuencias referencia de *Leptospira* (Método *Neighbor Joining Tree* con 1000 *bootstraps*). Muestras de Perro: P-173, P-39, P-79, P-149, P-151, P-171, P-144, P-148, P-09, P-48, P-105, P-85, P-41, P-35, P-27, P-70. Muestras de cerdo: C-149, C-184, C-118, C-81, C-172, C-129, C-123, C-114, C-173, C-95.

7.4. Estandarización del protocolo de PCR-HRM para la identificación de serovares patógenos de *Leptospira*

7.4.1. PCR-HRM del gen *rfbX* y análisis de *melting* de alta resolución

Se obtuvo una correcta amplificación de 18 de los 19 serovares patógenos de referencia con un Cq promedio de 28.2 (Min=25.9; Max=31.1) y una Tm consistente en las 3 réplicas técnicas, salvo 4 serovares (01M, 13M, 16M y 22M) que tuvieron una variación de 0.2 °C en 1 de los 3 pocillos. Sin embargo, los perfiles de *melting* de las 3 réplicas técnicas fue el mismo y se ubicaron en el mismo “*cluster*” o categoría. No amplificó ni el control negativo ni el control de esterilidad. El serovar que no amplificó fue *L. kirschneri* serovar Cynopteri (9M), a pesar de que se variaron la temperatura de hibridación y concentración de cebadores para este serovar (datos no mostrados) no se obtuvieron resultados. Por este motivo y por tener otro serovar representante de *L. kirschneri*, se optó por retirarlo del estudio.

Respecto a las temperaturas o picos de *melting*, se observó una clara separación a nivel de especie, salvo para los serovares patógenos pertenecientes a la especie *L. interrogans*, *L. noguchii* y *L. kirschneri*, los cuales obtuvieron una Tm entre 80 a 80.8 °C. Mientras que *L. borgpetersenii* obtuvo una Tm de 81.6°C para el serovar Ballum y 82.2°C para el serovar Tarassovi. Por otro lado, *L. weilii* sv Celledoni obtuvo una Tm de 83.2°C y *L. santarosai* una Tm de 84.8°C (Figura 21).

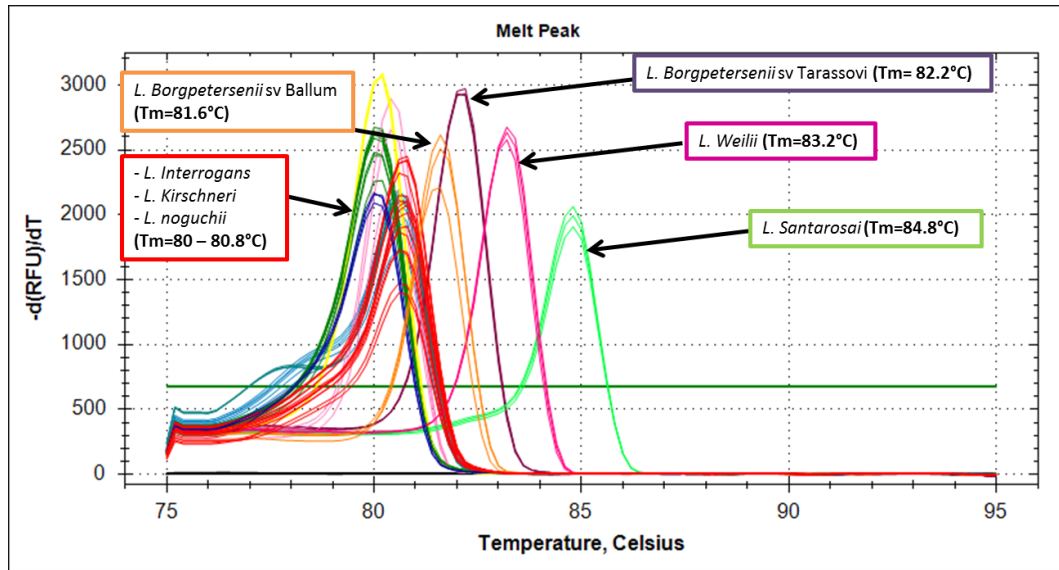


Figura 21. Gráfico de la regresión negativa de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM. Se muestran los picos de *melting* de los 18 serovares patógenos de referencia amplificados por la PCR-HRM del gen *rfbX*.

El resultado del análisis de *melting* de alta resolución clasificó los 18 serovares patógenos de referencia en 11 *clusters* o categorías con un nivel de confianza promedio >97%. En el *cluster* 01, el *cluster* referencia, se ubicaron 5 serovares de *L. interrogans*. En el *cluster* 02, 3 serovares de *L. interrogans*. En el *cluster* 03, 2 serovares de *L. interrogans*. El resto de serovares fueron clasificados en 1 *cluster* cada uno, del *cluster* 04 al 11 (Tabla 11). La diferencia entre los perfiles de *melting* de los *cluster* se puede observar en el gráfico de curvas diferenciales (*Difference curve*) usando el *cluster* 01 como línea base (Figura 22).

Tabla 11. Clasificación de 18 serovares referencia de *Leptospira* mediante

PCR-HRM

Código	Serovar	Tm^a	Cluster	Valor de confianza^a
01M	<i>L. interrogans</i> Australis sv Australis	80.6*		99.3
02M	<i>L. interrogans</i> Autumnalis sv Autumnalis	80.8		99.8
05M	<i>L. interrogans</i> Australis sv Bratislava	80.6	1	99.6
06M	<i>L. interrogans</i> Canicola sv Canicola	80.8		99.4
10M	<i>L. interrogans</i> Djasiman sv Djasiman	80.6		99.6
08M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Copenhageni	80		99.0
13M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Icterohaemorrhagiae	80*	2	99.1
22M	<i>L. interrogans</i> Pyrogenes sv Pyrogenes	80*		99.1
19M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Mankarso	80.6	3	99.9
21M	<i>L. interrogans</i> Sejroe sv Hardjo	80.6		99.8
12M	<i>L. kirschneri</i> Grippytyphosa sv Grippytyphosa	80.2	4	99.9
15M	<i>L. noguchii</i> Panam sv Panama	80.4	5	99.9
17M	<i>L. interrogans</i> Sejroe sv Wolfii	80.6	6	100.0
03M	<i>L. borgpetersenii</i> Ballum sv Ballum	81.6	7	99.5
16M	<i>L. borgpetersenii</i> Tarassovi sv Tarassovi	82.2*	8	99.8
07M	<i>L. weilii</i> Celledoni sv Celledoni	83.2	9	99.9
11M	<i>L. santarosai</i> Mini sv Georgia	84.8	10	100.0
04M	<i>L. interrogans</i> Bataviae sv Bataviae	80	11	97.8

^a Se muestra el valor promedio de las 3 réplicas técnicas

* Valores con variación de Tm de 0.2°C en una de sus réplicas técnicas

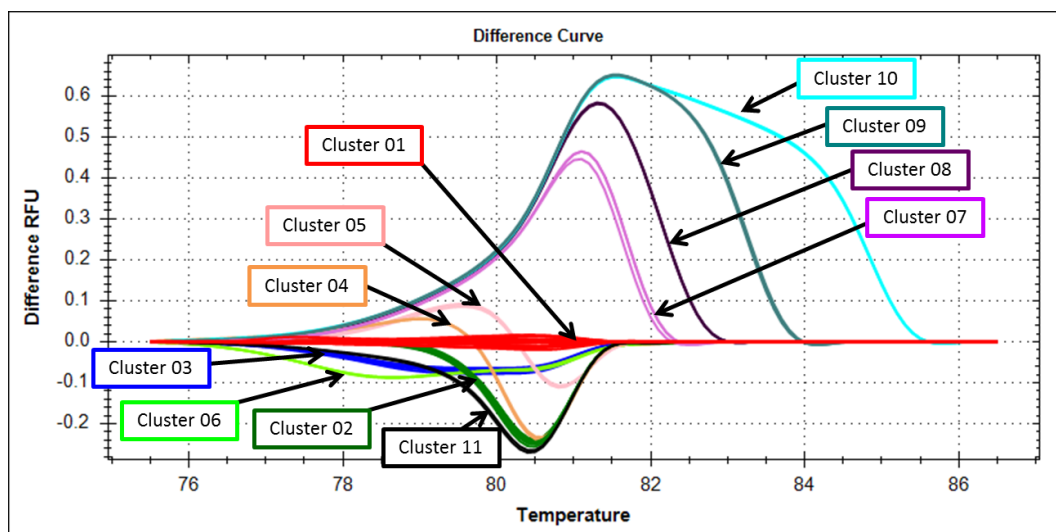


Figura 22. Gráfico de la Diferencial de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM. Se muestran las curvas diferenciales de los 18 serovares clasificados en 11 *cluster* con el *cluster* 01 como línea base o referencia.

7.4.2. Sensibilidad y especificidad analítica de la PCR-HRM

La sensibilidad analítica para cada uno de los 3 cebadores por separado, en la matriz de orina de cerdo y perro se muestra en la tabla 12. Los cebadores diseñados para la especie *L. borgpetersenii* resultaron tener mayor sensibilidad tanto para muestras de orina de perro (5×10^2 leptospiras/ml) como de cerdo (5×10^3 leptospiras/ml) (Tabla 12). Las temperaturas de *melting* se mantuvieron consistentes en todas las diluciones salvo la dilución de *L. interrogans*, de 5×10^3 leptospiras/ml de orina de perro y 5×10^4 leptospiras/ml de orina de cerdo, con una variación de 0.2°C ; además de la dilución de *L. borgpetersenii*, de 5×10^2 leptospiras/ml de orina de perro, con una variación de 0.2°C . La clasificación en *clusters* por HRM no fue confiable a diluciones bajas de leptospiras en orina, sin embargo, en el gráfico de las curvas diferenciales, visualmente se podían distinguir

de manera clara los perfiles de *melting* pertenecientes a cada especie de *Leptospira* (Figura 23).

Tabla 12. Sensibilidad analítica de los 3 cebadores de la PCR-HRM

Matriz	<i>L. interrogans</i> sv	<i>L. santarosai</i> sv	<i>L. borgpetersenii</i>
	Copenhageni (bacterias/ml)	Georgia (Bacterias/ml)	sv Ballum (Bacterias/ml)
Orina de perro	5×10^3	5×10^3	5×10^2
Orina de cerdo	5×10^4	5×10^4	5×10^3

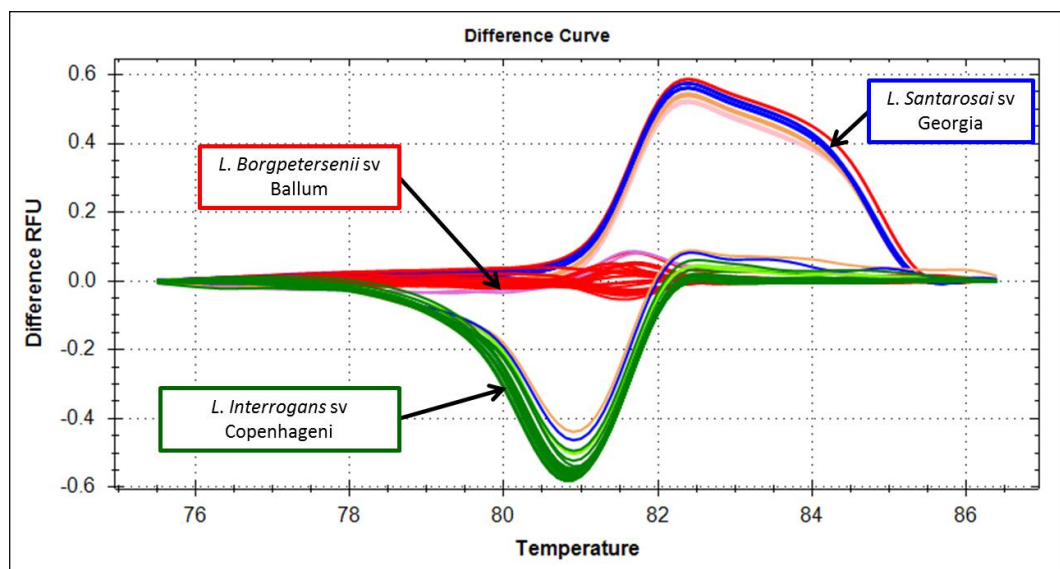


Figura 23. Gráfico de la Diferencial de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM para distintas diluciones de *Leptospira* en orina

En cuanto a especificidad analítica, los 3 pares de cebadores diseñados presentan alta especificidad por las 6 especies de serovares patógenos de *Leptospira* spp. No amplificó el control de esterilidad, ni control negativo de especie cercana (*L. biflexa* y *L. licerasiae*) ni lejana (mezcla de Gram (+) y Gram (-)). Sin embargo 2 de los 3 pares de cebadores por separado presentaron amplificación cruzada inter-especie con Cq tardío (Cq > 40). Con los cebadores para *L. santarosai* y *L. weilii*, se observó una amplificación cruzada con el serovar *L. kirschneri* sv Grippotyphosa, con un Cq > 40 y Tm=80.4°C (Figura 24.B). Con los cebadores para *L. borgpetersenii* se obtuvo una amplificación cruzada con el serovar *L. santarosai* sv Georgia, con un Cq > 40 y Tm=84.8°C (Figura 24.C). Además, con estos mismos cebadores se obtuvo una amplificación del serovar *L. weilii* sv Celledoni (Cq=34 y Tm=83,2°C), por ser inusual se realizó la evaluación de este serovar con una batería de 22 antisueros, observándose aglutinación no solo el antisuero de *L. weilii* sv Celledoni, sino también con el de *L. borgpetersenii* sv Javanica (datos no mostrados). De esta manera se confirmó serológicamente (fenotipo) la contaminación detectada por la PCR-HRM (genotipo).

En cuanto al análisis de *melting* de alta resolución, se unieron los resultados de los 3 pares de cebadores por separado en un solo análisis. Se observó la misma clasificación en 11 *clusters* obtenida cuando se utilizaron los 3 pares de cebadores juntos en una sola reacción PCR-HRM (datos no mostrados).

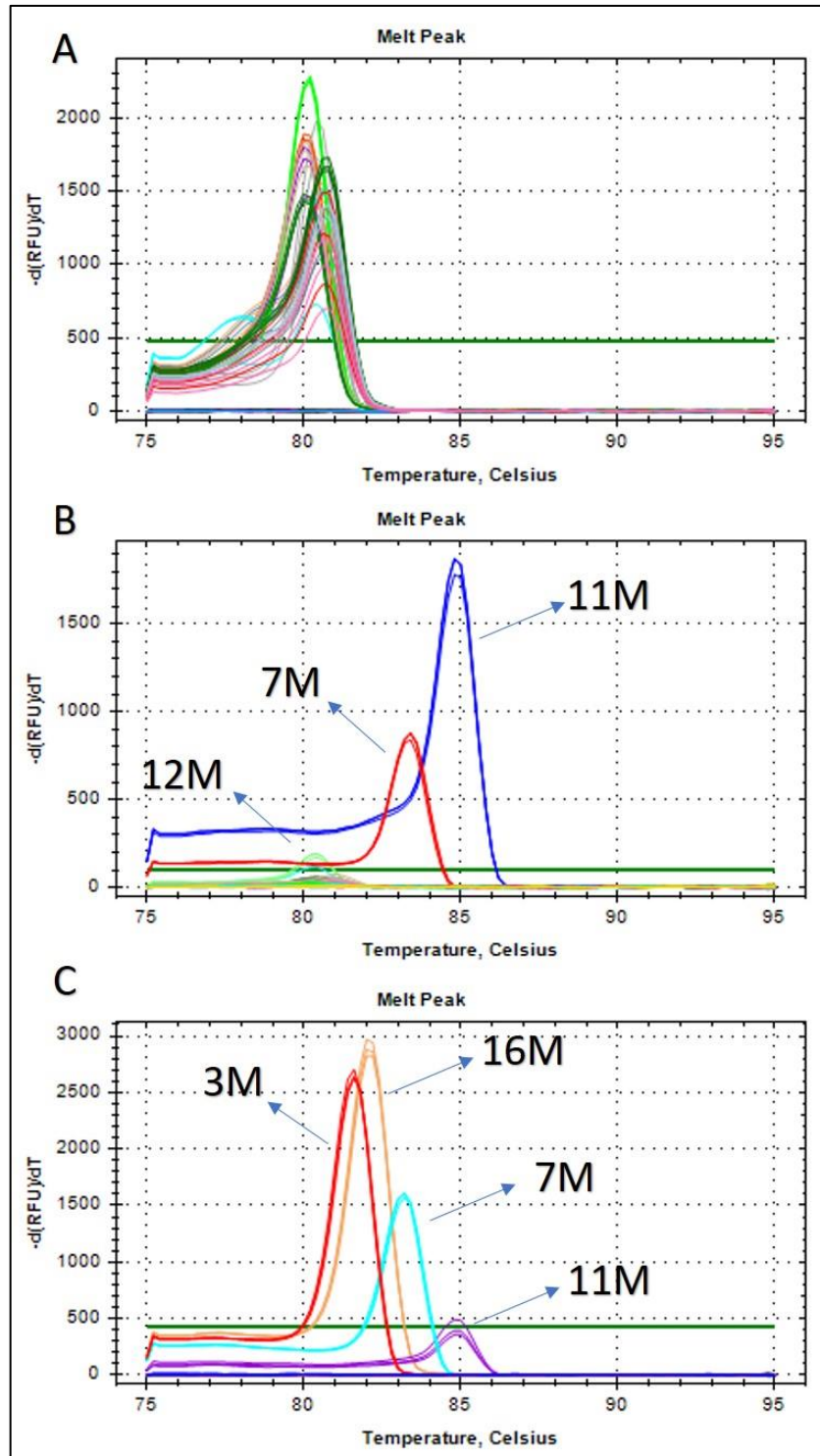


Figura 24. Gráfico de la regresión negativa de RFU vs Temperatura de la PCR-HRM de los Cebadores para *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. noguchii* (A), Cebadores para *L. santarosai* y *L. weilii* (B) y Cebadores para *L. borgpetersenii* (C). 3M: *L. borgpetersenii* sv Ballum. 7M: *L. weilii* sv Celledoni. 11M: *L. santarosai* sv Georgia. 12M: *L. kirschneri* sv Grippytyphosa. 16M: *L. borgpetersenii* sv Tarassovi.

7.4.3. Eficiencia de tipificación y poder discriminatorio

Se obtuvo una eficiencia de tipificación de 94.7% y un poder discriminatorio (Índice de diversidad de Simpson) de 0.92.

7.4.4. Reproducibilidad de la PCR

En las 5 repeticiones no se obtuvieron variaciones ni en T_m ni clasificación de *clusters*. Por lo tanto, se consideró una reproducibilidad del 100%.

7.5. Identificación molecular de leptospiras patógenas a nivel de serovar

De las 19 muestras de orina de perro positivas a *Lip132*, 21% (4/19) pudieron ser amplificadas por el protocolo de PCR-HRM estandarizado. Mientras que ninguna muestra de orina de cerdo pudo ser amplificada. De las 4 muestras de perro, 1 (LB/P-148) fue clasificada en el *cluster* 11 junto a *L. interrogans* Bataviae sv Bataviae, mientras que las otras 3 fueron clasificadas en un nuevo *cluster* 12 (Tabla 13).

Tabla 13. Clasificación de 4 muestras de perro positivas a qPCR *Lipl32* mediante PCR-HRM

Código	Serovar	Tm^a	Cluster	Valor de confianza^a
01M	<i>L. interrogans</i> Australis sv Australis	80.6		99.3
02M	<i>L. interrogans</i> Autumnalis sv Autumnalis	80.8		99.8
05M	<i>L. interrogans</i> Australis sv Bratislava	80.6	1	99.6
06M	<i>L. interrogans</i> Canicola sv Canicola	80.8		99.4
10M	<i>L. interrogans</i> Djasiman sv Djasiman	80.6		99.6
08M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Copenhageni	80		99.0
13M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Icterohaemorrhagiae	80	2	99.1
22M	<i>L. interrogans</i> Pyrogenes sv Pyrogenes	80		99.1
19M	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae sv Mankarso	80.6	3	99.9
21M	<i>L. interrogans</i> Sejroe sv Hardjo	80.6		99.8
12M	<i>L. kirschneri</i> Grippytyphosa sv Grippytyphosa	80.2	4	99.9
15M	<i>L. noguchii</i> Panam sv Panama	80.4	5	99.9
17M	<i>L. interrogans</i> Sejroe sv Wolfii	80.6	6	100.0
03M	<i>L. borgpetersenii</i> Ballum sv Ballum	81.6	7	99.5
16M	<i>L. borgpetersenii</i> Tarassovi sv Tarassovi	82.2	8	99.8
07M	<i>L. weilii</i> Celledoni sv Celledoni	83.2	9	99.9
11M	<i>L. santarosai</i> Mini sv Georgia	84.8	10	100.0
04M	<i>L. interrogans</i> Bataviae sv Bataviae	80	11	97.8
P-148	Muestra de orina de perro	80		91.9
P-144	Muestra de orina de perro	80.4		98
P-171	Muestra de orina de perro	80.4	12	90.8
P-173	Muestra de orina de perro	80.2		97.1

^a Se muestra el valor promedio de las 3 réplicas técnicas

7.6. Análisis de asociación entre especie patógena de *Leptospira* y tipo de reservorio

Mediante un test exacto de Fisher se encontró asociación entre al menos una especie de *Leptospira* y su tipo de reservorio ($p=0.002$) (Tabla 14). Lo que es más, mediante el mismo test, se halló asociación específicamente entre *L. santarosai* y el cerdo ($p=0.001$), pero no se pudo hallar asociación entre *L. interrogans* y el perro ($p=0.248$).

Tabla 14. Especies de *Leptospira* identificadas según tipo de reservorio

		Especie de <i>Leptospira</i> excretada (n(%))			p**
		<i>L. interrogans</i>	<i>L. santarosai</i>	<i>L. noguchii</i>	
Tipo de reservorio*	Perro (n=16)	9 (56.2)	1 (6.3)	6 (37.5)	0.002
	Cerdo (n=10)	3 (30.0)	7 (70.0)	0 (0.0)	

* Solo se detallan las muestras positivas que pudieron ser secuenciadas y clasificadas filogenéticamente por 16S

** Valor de p del Test exacto de Fisher

Por otro lado, también se evaluó, mediante un test de ANOVA, el Log_{10} de los niveles en que eran excretadas *L. interrogans* 1.15, IC 95% (0.26 – 2.03), *L. noguchii* 0.83, IC 95% (-0.1 – 1.7) y *L. santarosai* 0.07, IC 95% (-0.64 – 0.77), encontrándose que la diferencia de medias no era estadísticamente significativa ($p=0.195$) (Figura 25).

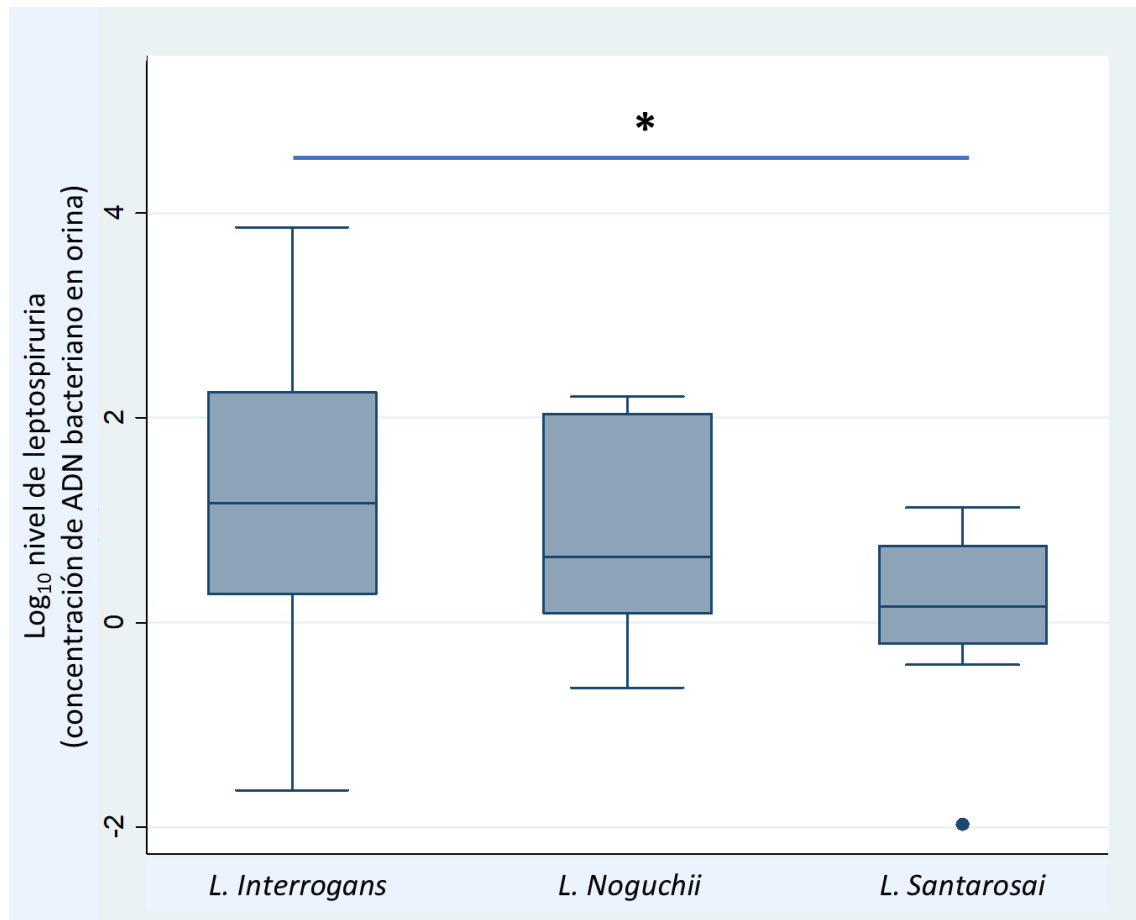


Figura 25. Diferencias entre el Log₁₀ de nivel de excreción de las 3 especies de *Leptospira*. Gráfico de Caja y bigote (Línea central, mediana; Límites de la caja, Rango intercuartil (IQR); Bigotes, 1.5 x IQR; Punto, *Outlier*) de los niveles de excreción de *L. interrogans* (n=11), *L. Noguchii* (n=8) y *L. Santarosai* (n=6) en orina de ambos reservorios. Test de ANOVA, * p >0.05

VIII. DISCUSION

Los principales hallazgos del presente trabajo sirven para demostrar que los perros y cerdos son importantes portadores asintomático de leptospiros patógenas en Belén. A pesar de que la prevalencia de excreción de *Leptospira* en perros (15%) es mayor que en cerdos (9.8%), esta no está asociada al tipo de reservorio ($p=0.21$). Sin embargo, el mayor nivel de excreción promedio de *Leptospira* en orina de perros si presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto a la de los cerdos ($p=0.0024$). Asimismo, las especies de *Leptospira* excretadas en orina si presentan asociación con el tipo de reservorio ($p=0.002$), sugiriendo una aparente preferencia de *L. interrogans* para colonizar el riñón de perros y *L. santarosai* el de cerdos, en el específico escenario urbano de Belén. No obstante, se necesitará mayor investigación para definir el rol exacto de los perros y cerdos en la transmisión de leptospiros patógenas a humanos. Así como la habilidad de determinadas especies o serovares excretados por estos, en cuanto a supervivencia en el medio ambiente y capacidad infectiva en el contexto endémico de la amazonia peruana.

Por otro lado, el novedoso método de identificación de serovar en base al análisis de *melting* de alta resolución del gen *rfbX*, mostró prometedores resultados. Con una eficiencia de tipificación de 94.7%, un poder discriminatorio (Índice de diversidad de Simpson) de 0.92 y una reproducibilidad del 100%, logro clasificar 18 serovares patógenos de *Leptospira* en 11 *clusters* con un nivel de confianza mayor al 97%. Sin embargo, dada su sensibilidad analítica y la limitada cantidad de copias de genoma/reacción de *Leptospira* en las muestras de orina, el sistema solo

logro identificar con éxito el serovar de 4 muestras de perro. Siendo la primera vez hasta la fecha que se reporta a *L. interrogans* serovar Bataviae en orina de perros en la amazonia peruana (nivel de confianza 92%). No cabe duda que se necesita ampliar la investigación en métodos de tipificación de *Leptospira* independientes de cultivo, así como de técnicas para la obtención de material genético idóneo para este tipo de estudios. De esta manera se podría entender mejor el real escenario de la leptospirosis en el Perú y mejorar los planes de control durante brotes en regiones vulnerables a los efectos del cambio climático.

Para desarrollar la discusión de los principales hallazgos del presente trabajo de investigación, esta se ha dividido en 3 puntos relevantes.

8.1. Prevalencia y nivel de excreción de leptospiras patógenas en perros y cerdos de Belén

Gran parte de la evidencia que propone a diversos mamíferos como reservorios de leptospiras patógenas está basada en la detección indirecta de anticuerpos contra *Leptospira* mediante el estándar de oro, MAT. En la región latinoamericana, se estima que la seroprevalencia promedio en perros es de 20.1%, con *L. interrogans* serovar Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes como los más prevalentes. Mientras que en cerdos se estima en 21.1%, con *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae y Pomona como los más prevalentes (65,66).

En la capital de nuestro país, la seroprevalencia en perros es mayor al promedio de la región, con un 58% y *L. interrogans* sv Canicola y *L. borgpetersenii* sv Tarassovi como los más prevalentes (16). Esta alta seroprevalencia se observa también en dos estudios llevados a cabo en Ucayali y Chancay, donde se reportaron

seroprevalencias de 52.2% y 27.8% respectivamente. Además, los serovares más prevalentes, *L. interrogans* sv *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*, coincidían con los reportados para humanos en las mismas localidades. Lo que sugiere una posible participación de los canes en el ciclo de transmisión de leptospirosis en esas dos regiones (67,68).

Por otro lado, en los cerdos traspatio de Lima se encontró una seroprevalencia de 85.8% con *L. interrogans* sv *Icterohaemorrhagiae*, y *Pomona* y *L. santarosai* sv *Georgia* como los más prevalentes (15). Esta alta seroprevalencia se observa también en otras localidades de México (61%) (69) y Colombia (56%) (70). Esto sugeriría una importante exposición de los cerdos a leptospiras patógenas, y además una posible fuente de transmisión de leptospirosis para los humanos en la región latinoamericana.

Esta información de seroprevalencia ha tenido pocas ocasiones de ser corroborada por la detección directa del patógeno. Dada su particular biología, el aislamiento de *Leptospira* es tedioso y poco exitoso (54). En el presente estudio no se lograron aislar leptospiras patógenas de 127 muestras de orina de perro, 123 de cerdo y 166 muestras de riñón de cerdo, a pesar de que se obtuvieron muestras de orina positivas a qPCR *Lipl32*. Similares resultados de nulo o poco éxito en el cultivo paralelo al análisis molecular se han reportado previamente (71,72). Por otro lado, a pesar de ser los riñones las muestras de elección para el aislamiento microbiológico, se ha reportado para el mismo individuo aparentemente saludable, resultados negativos en estos órganos y positivos en tejido hepático y tracto reproductivo (71). Sugiriendo una reconsideración en la elección de órganos blancos para intentar el aislamiento de *Leptospira*.

Pese a que los reportes seroepidemiológicos nos dan una buena aproximación al estudio de la leptospirosis, existe evidencia que sugiere que no sería el enfoque correcto para el estudio de los reservorios animales. Debido a que estos portan la bacteria crónicamente, la producción de anticuerpos sería en muchos casos indetectable aun cuando se esté excretando la bacteria por la orina. Diversos estudios en perros y cerdos han detectado la bacteria en orina, mediante PCR o aislamiento bacteriano, en animales negativos a MAT (70–74). Lo que es más, en uno de ellos logró identificar mediante PCR, la excreción sostenida de *Leptospira* en orina de perro hasta por 14 semanas consecutivas, en las cuales el animal se mantuvo seronegativo (73). Esto sugiere que el enfoque molecular para detectar y medir la excreción de la bacteria en orina de los reservorios animales, es bastante acertado.

A pesar de esto, son pocos los estudios que reportan la leptospiuria, mediante métodos moleculares, en perros y cerdos alrededor del mundo. En el caso de los primeros, las frecuencias y métodos moleculares varían, con reportes desde 3.7% en Colombia (75), 7% en Irlanda (72), 8.2% en Estados Unidos (74), hasta 10.6% en Brasil (76). Mientras que en el caso de los segundos, tan solo se posee información proveniente de una comunidad rural del Ecuador, donde mediante la PCR del gen 16S se logró identificar excreción de leptospirosis patógenas en un 21.1% de cerdos (10).

Dentro de la amazonia peruana solo se posee evidencia, basada en la PCR, de la presencia de *Leptospira* en orina o riñones de roedores (20%), marsupiales (39%) y murciélagos (35%) (77). Por lo que el presente trabajo junto al de Eca (78) serían los primeros en reportar, mediante métodos moleculares, frecuencias de

excreción de leptospiros patógenas en orina de perro y cerdo en una localidad urbana de la amazonia peruana. Nuestros resultados reportan leptospirosis en el 15% de perros y 9.8% de cerdos, siendo la de perros una de las más altas de la región y la de cerdos un tanto baja comparada al reporte de Ecuador. Estos datos evidencian la participación de reservorios no roedores en el ciclo de mantenimiento y transmisión de la leptospirosis, tal y como lo sugieren recientes reportes alrededor del mundo (9,10,79). No obstante, futuros estudios serán necesarios para evaluar la capacidad de supervivencia de la bacteria en el medio ambiente y la probabilidad de ser efectivamente transmitida a los seres humanos en la amazonia peruana.

Asimismo, el presente estudio también cuantifica el nivel de excreción de leptospiros patógenas, encontrando una diferencia significativa en la excreción de *Leptospira* en orina de perro, superior a la de cerdo. En una revisión sistemática el nivel de excreción de leptospiros patógenas en diferentes reservorios se estima en (bacterias/ml orina): 5.7×10^6 en ratas, 1.4×10^2 en perros, 3.7×10^4 en vacas, 1.7×10^5 en venados y 7.9×10^2 en humanos (55). A pesar de la baja estimación en perros y humanos, al considerar el volumen de orina excretado al día, el autor estima una importante capacidad de excreción para ambos hospederos (1.6×10^5 bacterias/ml para perros y 1.3×10^6 bacterias/ml para humanos), mayor en algunos casos a la de los roedores (55).

Teniendo en cuenta que el gen *Lipl32* es un gen unicopia utilizado con éxito en trabajos previos para la cuantificación de leptospiros patógenas a partir de distintas matrices (72,80,81) y los datos obtenidos en el presente trabajo: (1) número de copias de genoma/reacción, (2) volumen de ADN utilizado para la qPCR *Lipl32*, (3) volumen de elución de ADN, (4) volumen de orina extraída y (5) la

perdida de ADN bacteriano debido al método de extracción. Podemos estimar una excreción promedio para perros de 1×10^5 bacterias/ml de orina y para cerdos 7.2×10^3 bacterias/ml de orina. En el caso de los perros, esta estimación estaría por encima del promedio reportado y solo comparable con un reporte de Irlanda de una excreción promedio de 5.9×10^4 bacterias/ml de orina (72). En el caso de los cerdos, el presente trabajo representaría el primer reporte referencial para el nivel de excreción en bacterias/ml de orina.

Es importante mencionar que a pesar de conocer los niveles de excreción de *Leptospira*/ml de orina de los distintos reservorios, la capacidad de estos para contaminar el medio ambiente depende de diversos factores, tales como la prevalencia de la leptospiuria, la densidad poblacional del reservorio en el área habitada por humanos, la frecuencia de contacto con estos y el nivel de participación que tengan en las actividades humanas diarias (82). En el caso particular de Belén, al considerar la estrecha convivencia de los canes con los seres humanos, más aún en temporadas de incremento del caudal del río que les impide abandonar la vivienda. Además, de la constante exposición de los matarifes a los cerdos, sin ningún nivel de protección, en los camales informales de Belén. Los resultados del presente estudio servirían como una alerta para reconsiderar el potencial riesgo que significan el perro y el cerdo en la transmisión de la leptospirosis a humanos en la amazonia peruana. El mismo que necesitaría ser esclarecido con mayores estudios.

Finalmente, las limitaciones que encuentra este punto del trabajo de investigación están relacionadas a la obtención del material genético a partir de una matriz tan complicada como la orina. Estas limitaciones trataron de explorarse con el análisis de calidad de ADN. Uno de los puntos críticos del protocolo fue el paso

de centrifugación para la obtención del *pellet* del que se extrajo el ADN. Tanto la velocidad como el tiempo varían en protocolos previos en los cuales también se hace la detección de *Leptospira* en orina mediante métodos moleculares (62,72). Con el protocolo utilizado en el presente estudio, Eca (78) reportó que la cantidad de copias de genoma de *Leptospira* del ADN extraído era alrededor de 100 veces menor a la cantidad de bacterias presentes inicialmente en la orina (78). Por lo que, mayores estudios sobre el proceso de extracción y conservación de material genético a partir de orina serán necesarios. Finalmente, y a pesar de su baja sensibilidad, el aislamiento bacteriano siempre es alentado en los estudios epidemiológicos de leptospirosis, dado que las bacterias aisladas pueden utilizarse de diversos modos posteriormente (54). Este objetivo no pudo ser concretado en el presente estudio.

8.2. Especies de *Leptospira* excretada por los reservorios no roedores y su asociación al tipo de reservorio en Belén

Hace 35 años la clasificación del género *Leptospira* se basaba tan solo en una especie patógena, *Leptospira interrogans*, y una especie saprofita, *Leptospira biflexa* (31). En la actualidad, gracias a las técnicas de hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen *rrs* (16S), se ha logrado clasificar el género en 23 especies (47,48,83). A pesar de esto, la clasificación más importante para la epidemiología de la enfermedad sigue siendo la de serovares, los cuales de acuerdo a su similitud antigénica son agrupados en serogrupos (2). Sin embargo, llegar a este nivel de identificación taxonómica de subespecie es técnicamente laborioso y generalmente está relegado a pocos centros diagnósticos de referencia (54), por lo que muchos resultados epidemiológicos alrededor del mundo son reportados a nivel de especie.

Nuestros resultados muestran que la amplificación parcial del gen 16S (62) como método de diagnóstico resultó ser bastante sensible y específico para el género, más aun al adicionar la estrategia de una segunda ronda de PCR. Se logro amplificar hasta 5 leptospiras/ml de orina de perro y 50 leptospiras/ml de orina de cerdo. Además, los productos de PCR generados demostraron tener una calidad aceptable para determinar la especie. Pese a la discutida calidad y cantidad de las muestras de ADN de orina de perro y cerdo, solo tuvieron que descartarse 3 muestras de 19 de perro y 2 de 12 de cerdo, por mala calidad de secuenciación.

El presente estudio reporta en orina de perro las especies *L. interrogans*, *L. noguchii* y *L. santarosai*, mientras que en cerdo las especies *L. interrogans* y *L. santarosai*. Además, es el primero en mostrar asociación entre al menos una especie de *Leptospira* patógena excretada y el tipo de reservorio. Sin embargo, debido al poco número de muestras positivas no fue posible establecer, bajo rigor estadístico, que especie de *Leptospira* patógena estaba asociada a qué tipo de reservorio de manera específica. A pesar de esto, al observar la distribución de especies por tipo de reservorio (Tabla 14) se podría sugerir una aparente preferencia de *L. interrogans* por la colonización renal en perros y *L. santarosai* por la de cerdos. Estos resultados necesitaran de futuras investigaciones, con un mayor número de muestras positivas, para esclarecer esta evidencia preliminar de asociación *Leptospira* – reservorio.

Los reportes en la región latinoamericana, basados en aislamiento microbiológico o PCR a partir de orina, evidencian una mayor diversidad de especies de leptospiras patógenas en cerdos que en perros. En Brasil se ha identificado con alta frecuencia en cerdos a *L. interrogans* serovar Pomona en

Brasil (66). Mientras que, en contraste al presente estudio, en Argentina si se ha logrado identificar en cerdos a *L. noguchii* (66). Esto también difiere de lo reportado en Ecuador, donde también mediante la secuenciación parcial del gen 16S, se detectó *L. borgpetersenii*, además de *L. santarosai* y *L. interrogans*, aquí también reportadas (10). En cuanto a perros, en Brasil también se identificó a *L. noguchii* y *L. interrogans* (66). Notablemente, en otro estudio hecho en Sao Paulo, también mediante amplificación parcial del gen 16S, se reporta en perros una excreción crónica de *L. interrogans* (8.13%) y de *L. santarosai* (2.43%) en un entorno urbano (76). Además, se aísla a *L. santarosai* serogrupo Sejroe a partir de orina de perro (73), la cual ya ha sido identificada como agente de leptospirosis en humanos en otras partes del mundo (84), demostrando por primera vez la participación de este reservorio en la transmisión *L. santarosai* en un entorno urbano. Nuestros resultados sugieren que esta cadena de transmisión también podría estar ocurriendo en la amazonia peruana.

Dentro del Perú, los reportes serológicos de perros en Lima, Cañete y Ucayali, coinciden con nuestros resultados de identificación de especie, ya que los serovares reportados pertenecían a la especie *L. interrogans* (16,67,68). Del mismo modo, coinciden con lo reportado para cerdos traspatio en Lima, donde uno de los serovares más prevalentes reportado pertenecía a la especie *L. santarosai* (15). Es importante resaltar que el presente estudio, mediante secuenciación parcial del gen 16S, es el primero en reportar las especies de leptospiras patógenas que son excretadas por perros y cerdos en la amazonia peruana. Hasta el momento solo se tenía información por 16S de las especies portadas en los riñones de murciélagos: *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* y *L. fainei* (85). Mostrando que, a

pesar de pertenecer a la misma región geográfica, las especies de *Leptospira* varían ampliamente de reservorio en reservorio.

En general los estudios de detección directa de *Leptospira* en el Perú, mediante métodos moleculares, son muy pocos. Un importante estudio realizado con 111 aislamientos de *Leptospira* (40 de humanos, 49 animales y 22 ambientales) de todo el Perú desde el 2002 al 2010, utilizando la genotipificación molecular mediante PFGE, reporta a *L. santarosai* (49.5%) y *L. interrogans* (37.1%) como las especies más frecuentes (86). De manera particular en aislamientos de humanos de la amazonia peruana, se reporta 51.1% para *L. santarosai* y 30.9% para *L. interrogans*. Dada la frecuencia de *L. interrogans* (56.3% para perros y 30% para cerdos) en nuestros resultados, se podría sugerir una mayor participación de los perros en la transmisión de esta especie en Belén. Lo opuesto sucedería para *L. santarosai* (6.2% para perro y 70% para cerdo), donde aparentemente los cerdos podrían estar más involucrados. Sin embargo, se necesitará mayor investigación a un nivel molecular más profundo para corroborar lo que nuestros resultados sugieren.

Cabe resaltar que en el estudio mencionado (86) también se reporta una alta frecuencia de *L. santarosai* en aislamientos ambientales y de marsupiales, además de alta frecuencia de *L. interrogans* en aislamientos de roedores, sugiriendo otras fuentes de transmisión de estas leptospiras patógenas a los seres humanos.

Finalmente, la limitación de este punto consiste en el poco número de muestras positivas. Esto imposibilita, mediante un sustento estadístico valedero, establecer una asociación clara entre una determinada especie con un tipo de reservorio específico. Del mismo modo, la asociación entre volumen de

leptospirosis y especie de *Leptospira* tampoco ha sido explorada en este estudio. Por lo que nuestros resultados podrían ser tomados como un reporte preliminar que podría ser corroborado o contrastado con una mayor población muestral, en la misma u otra localidad de la amazonia peruana.

8.3. El análisis de *melting* de alta resolución y su aplicación para la identificación de serovar de *Leptospira* independiente de cultivo

Es indiscutible la necesidad de comprender, bajo el contexto de “una salud”, el rol de los reservorios animales en el mantenimiento y transmisión de la leptospirosis en la amazonia peruana (66). La identificación de los serovares excretados por estos podría esclarecer la epidemiología de la enfermedad y encaminar las medidas de prevención de manera específica tanto para animales como para humanos. En la actualidad existen métodos moleculares independientes o no de cultivo, que intentan encontrar solución a la complicada serotipificación. Dentro de los más importantes están el PFGE, MLVA, MLST y HRM (12). El ultimo ha venido siendo explorado con variable éxito en recientes reportes.

Tulsiani y colaboradores (87) analizan mediante HRM 13 marcadores producto del RAPD PCR, logrando tipificar serovares de 4 especies patógenas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirshneri* y *L. weilii*. Además de necesitar una buena concentración de ADN (10 ng ADN/ μ l) y utilizar muchos cebadores, el reporte no incluye en su análisis a los serovares de *L. santarosai* ni *L. noguchii*. Luego Naze y colaboradores (88) evalúan 7 marcadores VNTR (*Variable number of tandem repeats*) para analizar por HRM los serovares de *L. interrogans*, *L. kirscheneri*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*. Esta técnica logra tener 100% de reproducibilidad, 100% tipeabilidad e Índice de diversidad de 0.98. Sin embargo,

solo 77% de cepas fueron discriminadas a nivel serovar y se necesitaba una buena concentración de ADN para que el protocolo tenga 100% tipeabilidad (8250 copias/ml). Finalmente, Eca (78) produce el primer reporte en Perú de un sistema de HRM con 3 marcadores polimórficos (*Lipl32*, *LpxC* y *SecY*), obteniendo una reproducibilidad de 100%, eficiencia de tipificación de 85% (confidencia mayor al 90%) e Índice de diversidad de 0.94. Además de tener una buena sensibilidad (10 bacterias/ μ l), este protocolo logra incluir 19 serovares de 6 especies patógenas de *Leptospira*.

El presente estudio estandarizó un protocolo desarrollado por el grupo de investigación en UCSD, basando en el análisis HRM del gen *rfbX* (también llamado *wzx*, translocasa del antígeno O), localizado dentro del operón *rfb* encargado de la biosíntesis del antígeno O del LPS de *Leptospira* (Lubar *et al.*, manuscrito en preparación). La tipificación basada en el operón del antígeno O ha sido exitosa en bacterias como *E. coli*, *S. enterica* y *Y. pseudotuberculosis*. Sin embargo, debido a la falta de secuencias anotadas para el operón *rfb* (antígeno O) para el género *Leptospira* y la significativa variación que presenta esta secuencia entre los diversos serogrupos, la genotipificación basada en este operon no ha sido explorada debidamente (89). Por lo que el protocolo propuesto por Lubar y estandarizado en el presente trabajo sería uno de los pioneros en el campo. Cabe tener en cuenta que la síntesis de LPS en *Leptospira* es por la vía *Wzy*-dependiente, por lo que los genes de esta vía relacionados a la glicosiltransferasa y al ensamblaje de azúcares del AgO, tales como *wzx* (translocasa del AgO) y *wzy* (polimerasa del AgO), serían lo suficientemente específicos para poder discriminar al menos entre serogrupos (89).

Nuestros resultados muestran que los 3 pares de cebadores al usarse juntos tienen una amplificación específica de las 6 especies patógenas más importantes de *Leptospira* spp. Lo que es más, nos muestra unos picos de *melting* bastante resueltos para 3 de ellas: *L. santarosai*, *L. weilii* y *L. borgpetersenii*, los cuales, sin necesidad de un análisis HRM y solo en base a su T_m podrían ser preliminarmente discriminados. En el caso de las otras tres especies, *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. noguchii*, su T_m entre 80 a 80.8°C no nos permite discriminar claramente entre ellas. Esto se debería a que para este marcador (*rfbX*) estas tres especies no tendrían los polimorfismos suficientes para ser detectados por análisis de *melting* de baja resolución (picos de *melting*). Sin embargo, para el caso particular de la amazonia peruana, donde *L. interrogans* y *L. santarosai* son los aislados más frecuentes (86), esta técnica sería lo suficientemente útil para discriminar estas dos especies basándose tan solo en su T_m .

Al usar los cebadores por separado se pudieron detectar unas amplificaciones inespecíficas no importantes entre especies, lo que no afectaría finalmente a los resultados que se puedan obtener con muestras de campo usando los 3 cebadores juntos. Lo más notorio fue la detección de una contaminación en nuestra cepa de referencia: *L. weilii* serovar Celledoni, con la cepa *L. borgpetersenii* serovar Javanica, la que luego fue corroborada por la aglutinación con antisueros específicos para ambos serovares. Esto sustentaría el concepto de que la heterogeneidad del LPS, detectada por la serotipificación, tiene una base congruente con los polimorfismos presentes en el gen *rfbX* y detectables por el presente protocolo de HRM. Pese a esto, el protocolo no pudo amplificar el gen *rfbX* de *L. kirschneri* serovar Cynopteri, presumiblemente por la amplia variedad

que existe en el operon *rfb* de algunos serovares (especialmente en el extremo 5') (89) y los mecanismos de transferencia horizontal que están involucrados en los genes de este (50), podría haber causado una modificación en las posiciones de los nucleótidos 169-192 o 410-434 del gen, donde los cebadores deberían de hibridar.

El análisis de *melting* de alta resolución nos muestra una clara y consistente clasificación de los 18 serovares en 11 clusters, con una confianza mayor a 97%, eficiencia de tipificación de 94.7%, reproducibilidad de 100% y un moderado índice de diversidad de 0.92. Además, se observa cuando menos, una notable discriminación a nivel de especie y en algunos casos a nivel de serovar. Mas aun, logra diferenciar al menos a nivel de serogrupo, a los tres serovares más seroprevalentes en perros reportados en Lima: Tarassovi, Canicola e Icterohaemorrhagiae (16), y dos de los más seroprevalentes en cerdos: Icterhaemorrhagiae y Georgia (15). En cuestión de serogrupos, se puede observar también la discriminación entre serovares del serogrupo Icterohaemorrhagiae y Sejroe. A pesar de no presentar la resolución esperada esta técnica nos da un acercamiento en alto grado a la tipificación molecular de *Leptospira* spp. Por otro lado, la baja sensibilidad de la técnica no solo podría deberse a una eficiencia de los cebadores sino también al método de extracción de ADN y la complicada matriz, que suele presentar problemas en la PCR y análisis tan específicos como el HRM (90). Cabe resaltar que la presencia de cristales y la baja concentración de ADN también podrían significar un obstáculo para el análisis de las muestras problema, dado que como se observa en el ensayo de LOD de este estudio podrían ocasionar una *clusterización* inadecuada con poca concentración de ADN.

Debido a la complicada clasificación serológica de *Leptospira* spp., muchas veces no congruente con su clasificación genética (8), el uso de herramientas moleculares para lograr una clasificación molecular confiable y de fácil uso, se ha vuelto un verdadero reto y una necesidad (12). Aunque la presente técnica no tenga la resolución de otras como el MLST, MLVA o PFGE, es un significativo aporte en camino a lograr este objetivo final. En la actualidad no existe una técnica molecular perfecta para la tipificación, sin embargo, el HRM en términos de practicidad, tiene una clara ventaja sobre las mencionadas. Identifica y tipifica a *Leptospira* spp. en un procedimiento a “tubo cerrado”, conservativo y de un solo paso con un tiempo promedio de 3 horas hasta obtener el resultado. No presenta pasos adicionales como el MLVA y el MLST que requieren electroforesis, secuenciación y análisis bioinformáticos (88).

Nuestros resultados muestran que solo 4 de 19 muestras de perro positivas a qPCR *Lipl32* y ninguna de cerdo, pudieron ser tipificadas mediante el PCR-HRM estandarizado. Aparentemente debido a la baja sensibilidad de la técnica. Otros factores como la eficiencia de los cebadores o la calidad de la muestra de ADN también pudieron haber influido. Sin embargo, dado el escaso éxito de aislamiento de *Leptospira* spp. a partir de muestras de orina (54), reflejado en la falta de aislamientos en el presente estudio, esta técnica presenta prometedores resultados en el camino a comprender el estado epidemiológico de la leptospirosis en el Perú. Asimismo, se revalora la información que se puede obtener de un tipo de muestra de fácil toma no invasiva como la orina. Algo importante a considerar también, es la estrategia de reamplificación de los productos de la PCR. En el presente estudio esta estrategia logro aumentar de 2 a 10 muestras de perro y de 0 a 9 muestras de

cerdo amplificadas por el PCR-HRM (datos no mostrados). Pero por no se parte del objetivo del trabajo y por considerarse resultados con presumible sesgo, no fueron considerados. No obstante, esta estrategia podría ser explorada como una modificación de la técnica en futuros estudios

En el presente trabajo de investigación se reporta por primera vez en la amazonia peruana, con 92% de confianza, la identificación de *L. interrogans* serovar Bataviae, mediante PCR-HRM, en una muestra de orina de perro. Cabe mencionar que, en el año 1958, Herrer y colaboradores reportan en lima el primer aislamiento a partir de riñón de perro, de *L. interrogans* serovar Bataviae (91). Esto contrasta con un reporte de seroprevalencia en Lima que se hizo en el 2015, donde no se identifica ningún perro seroreactivo a *L. interrogans* serovar Bataviae (16). Esto podría indicar una posible distribución actual de este serovar en la amazonia peruana y no en la costa, mas no se puede sugerir algo hasta no realizar un estudio de detección y tipificación directa de *Leptospira* spp. en orina de perro en Lima. Por otro lado, se ha identificado en aislamientos de zonas endémicas de la amazonia peruana, que los *clusters* más patógenos para humanos pertenecen a *L. interrogans* serogrupo Bataviae y *L. santarosai* serogrupo Sejroe (86). En este contexto, nuestros resultados podrían sugerir al perro como un reservorio de uno de los serogrupos más patógenos en la amazonia peruana. Futuros estudios, con una mayor población muestral, necesitan realizarse para medir la frecuencia de este suceso.

Nuestros resultados también muestran que 3 muestras de orina de perro son clasificadas en un *cluster* nuevo (Confianza promedio 95.3%). En base a los resultados de secuenciación de 16S estas muestras son clasificadas como *L. interrogans*, hecho que se confirma mediante el Tm obtenido por el PCR-HRM

(80.2-80.4°C). Por lo tanto, cabría esperar una clasificación de estas muestras en algún serovar previamente reportado como frecuente en perros, tal como *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae o serovar Canicola, los cuales también son frecuentemente detectados en humanos (86). Finalmente, en base a reportes previos, las muestras de cerdo que no pudieron ser tipificadas por el PCR-HRM podrían haber pertenecido a *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae o *L. santarosai* serovar Georgia, reportadas como seroprevalentes en Perú y Latinoamérica (15,66). Mientras que las muestras de perro podrían haber pertenecido a *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae o Canicola, *L. santarosai* serogrupo Sejroe o *L. noguchii* serogrupo Australis (16,66). Esto necesitaría ser confirmado por secuenciación profunda del ADN total de las muestras extraídas de orina de perros y cerdos positivos a qPCR *LipI32*.

Como parte de las limitaciones que encuentra este punto del estudio se podría considerar el poco número de cepas de referencia utilizadas para la estandarización del PCR-HRM. Además, de no haberse realizado la secuenciación de los productos de PCR, tanto de las cepas de referencia como de las muestras problema positivas, para corroborar la presencia de polimorfismos detectados por el análisis HRM. Por otro lado, debido a la limitada amplificación en muestras provenientes de orina, podría intentarse el PCR-HRM con cepas puras aisladas en el país y comparar los resultados con otra técnica de referencia como el PFGE o MLST. El método podría constituir una valiosa herramienta para realizar la tipificación molecular de aislamientos con una buena cantidad y calidad de ADN, considerando que deben tener por lo menos 1 ng de ADN/reacción o una carga

bacteriana de 5×10^3 leptospiras/ml y 5×10^4 leptospiras/ml de orina de perros y cerdos infectados naturalmente.

Para terminar, todos los resultados del presente estudio en conjunto cobran relevancia al reflexionar sobre la importancia de la investigación epidemiológica de la leptospirosis en el Perú. En la actualidad nuestro país presenta una de las más altas incidencias de leptospirosis (7.6 casos por cada 100 000 personas) en la región latinoamericana. Dentro del territorio, la ciudad de Iquitos es la que reporta la mayor cantidad de casos (6 casos por cada 100 000 personas) (92). Llama la atención también la duplicación del número de casos reportados en el verano 2017, respecto al 2016, en el norte del país y en algunas localidades como Contumazá y Palpa, que nunca presentaron casos anteriormente y que fueron afectadas por las lluvias, huaycos e inundaciones producto del fenómeno del niño costero (6). Debemos tener en cuenta que nuestro país es vulnerable a los efectos del cambio climático y que la leptospirosis en un futuro cercano tendrá una rápida evolución e impacto significativo en la salud humana debido al inminente calentamiento global (79,84,93). Por lo tanto, son necesarios los estudios que ayuden a comprender mejor el comportamiento de la enfermedad bajo el enfoque de “Una salud”, considerando el medio ambiente, el hombre y los animales, para fortalecer los métodos de prevención y control de la enfermedad en nuestro país.

IX. CONCLUSIONES

1. Se determinó, mediante qPCR, que el 15% de perros y el 9.8% de cerdos de los sectores 20 y 21 de Belén (Iquitos), excretan leptospiras patógenas en orina. La concentración de leptospiras patógenas en orina de perro es significativamente mayor a la de cerdos. No se encontró asociación entre esta excreción de leptospiras patógenas y el tipo de reservorio.
2. Se identificó mediante secuenciamiento del gen 16S, la excreción de *L. interrogans*, *L. noguchii* y *L. santarosai* en orina de perro, y *L. interrogans* y *L. santarosai* en orina de cerdos de los sectores 20 y 21 de Belén (Iquitos). Existe asociación entre al menos una especie de *Leptospira* y el tipo de reservorio: *L. santarosai* se encuentra asociada al cerdo.
3. Se estandarizó un protocolo de PCR con análisis de *melting* de alta resolución (PCR-HRM) para la identificación de serovares patógenos de *Leptospira* (eficiencia de tipificación 94.7%, reproducibilidad 100%, índice de diversidad 0.92 y sensibilidad de 5×10^3 y 5×10^4 bacterias/ml en orina de perro y cerdo respectivamente).
4. Se reporta por primera vez en la amazonia peruana, la excreción de *L. interrogans* serovar Bataviae en orina de perro, así como la identificación de 3 serovares aun no clasificados por la técnica (PCR-HRM), en el mismo tipo de muestra.

X. RECOMENDACIONES

Como parte de la ampliación del conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis en Belén, se recomendaría incluir a los roedores, reservorios convencionales, y a fuentes de agua y suelo en el estudio. De manera que se pueda observar un escenario más completo del ciclo de transmisión y mantenimiento de *Leptospira* en Belén. Asimismo, para hacer uso de las técnicas moleculares más vanguardistas, se recomendaría la secuenciación profunda de todas las muestras de ADN total de orina de perro y cerdo, positivas a qPCR *lipL32*. Tampoco debemos olvidar de alentar los valiosos intentos de aislar *Leptospira* a partir de muestras de humanos, animales y medioambiente de nuestra amazonia. Finalmente, se recomienda continuar los estudios para evaluar el real impacto de la excreción de leptospirosis patógenas por parte de los perros y cerdos en Belén. De manera que se determine con mayor precisión la habilidad de supervivencia de la bacteria en el medio ambiente y su capacidad infectiva a los seres humanos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(9):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
2. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;15(5):297–307. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
3. Z MC, J LB, Q DG, L RT. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2006;23(1):56–66. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36323109>
4. Johnson MAS, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT, Campos KJ, et al. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(6):1016–22.
5. Alarcón-Villaverde JO, Romani-Romani F, Tejada RA, Wong-Chero P, Céspedes-Zambrano M. Seroprevalencia de leptospirosis y características asociadas en agricultores de arroz de una región tropical del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2014 Jul 2 [cited 2018 Jan 26];31(2). Available from: <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/35>
6. Ministerio de Salud (MINSA). Perú. Boletín Epidemiológico del Perú: Enfermedades Transmitidas por Alimentos [Internet]. Vol. 7. 2017. 1374-1375 p. Available from: www.dge.gob.pe/boletin.php
7. Cabezas-Sánchez C. Enfermedades Infecciosas Desatendidas: Un Permanente Reto Para La Salud Pública Y La Equidad En El Perú. *Rev Peru Med Exp y Salud Pública* . 2014;31(2):326–35.
8. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009;7(10):736–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2208>
9. Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, Gomard Y, Pag??s F, et al. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–19.
10. Barragan V, Chiriboga J, Miller E, Olivas S, Birdsell D, Hepp C, et al. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9).
11. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. *Clin*

- Microbiol Infect [Internet]. 2011;17(4):494–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>
12. Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR, Hartskeerl RA. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol*. 2012;03(02):1–12.
 13. Quintero JÁL, Agudelo-Flórez P, Pereira MM, Peláez Sánchez RG. High-Resolution Melting Curve Analysis of the 16S Ribosomal Gene to Detect and Identify Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Colombian Isolates. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2018 Mar 5];96(5):1031–8. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.16-0312>
 14. Donaires LF, Céspedes MJ, Sihuincha MG, Pachas PE. Determinantes ambientales y sociales para la reemergencia de la leptospirosis en la región Amazónica del Perú, 2012. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(2):280–4.
 15. Luis Anampa V, Hermelinda Rivera G, Néstor Falcón P, Mariluz Arainga R, Mercy Ramírez V. Frequency of *Leptospira* spp in pigs from commercial farms and backyard breeding slaughtered in two abattoirs of Lima . *Frec Leptospira spp en Porc crianza Tec y traspatio Benef en dos mataderos Lima*. 2012;23(2):240–5.
 16. Juan Siuce M, Sonia Calle E, Chris J, Gabriela Pacheco S, Guillermo Salvatierra R. Identificación de Serogrupos Patógenos de *Leptospira* en Canes Domésticos. *Rev Investig Vet del Peru*. 2015;26(4):664–75.
 17. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757–71.
 18. McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2005 Oct [cited 2018 Sep 18];18(5):376–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148523>
 19. Abdulkader RCRM, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, da Silva MV. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. [cited 2018 Sep 18];44(2):79–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048544>
 20. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpiboon R, et al. Activation of the Coagulation Cascade in Patients with Leptospirosis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2018 Sep 18];46(2):254–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171258>
 21. Abdulkader RC. Acute renal failure in leptospirosis. *Ren Fail* [Internet]. 1997 Mar [cited 2018 Sep 18];19(2):191–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9101590>

22. Organización Mundial de Sanidad Animal. Capítulo 2.1.9. Leptospirosis. Man la OIE sobre Anim Terr [Internet]. 2008;1–15. Available from: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.Leptospirosis.pdf
23. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 1994 Nov [cited 2018 Sep 18];10(3):463–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728630>
24. Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM. Assessment of the Clinical Presentation and Treatment of 353 Cases of Laboratory-Confirmed Leptospirosis in Hawaii, 1974–1998. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2018 Sep 18];33(11):1834–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11692294>
25. Guidugli F, Castro AA, Atallah ÁN. Antibiotics for preventing leptospirosis. In: Guidugli F, editor. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2000 [cited 2018 Sep 18]. p. CD001305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034711>
26. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. Ceftriaxone Compared with Sodium Penicillin G for Treatment of Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 Jun 15 [cited 2018 Sep 18];36(12):1507–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802748>
27. Crump JA, Morrissey AB, Nicholson WL, Massung RF, Stoddard RA, Galloway RL, et al. Etiology of Severe Non-malaria Febrile Illness in Northern Tanzania: A Prospective Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 Jul 18 [cited 2018 Sep 18];7(7):e2324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002324>
28. Bruce MG, Sanders EJ, Leake JAD, Zaidel O, Bragg SL, Aye T, et al. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. *Acta Trop* [Internet]. 2005 Oct [cited 2018 Sep 18];96(1):36–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083836>
29. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *Carvalho MS*, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Apr 16 [cited 2018 Sep 22];9(4):e0003709. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003709>
30. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez M-G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *de Silva N*, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Jul 24 [cited 2018 Sep 22];8(7):e2865. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002865>
31. Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. Second. Adler B, editor. Heidelberg: Springer; 2015. 293 p.

32. Ristow P, Bourhy P, McBride FW da C, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *PLoS Pathog* [Internet]. 2007 [cited 2018 Sep 22];3(7):e97. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030097>
33. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* [Internet]. 2002 May [cited 2018 Sep 22];70(5):2311–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953365>
34. Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Santos CS, Reis MG, Ko AI, et al. Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2018 Sep 22];76(12):5826–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809657>
35. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang T-H, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2017 Aug 27];2(4):346–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276206>
36. Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, et al. A Methylated Phosphate Group and Four Amide-linked Acyl Chains in *Leptospira interrogans* Lipid A. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jun 11 [cited 2018 Sep 22];279(24):25420–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044492>
37. Nahori M-A, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CRH, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2017 Aug 27];175(9):6022–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16237097>
38. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, David R, Lovett MA, Blanco DR. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. 2005;73(6):3251–60.
39. Charon NW, Greenberg EP, Koopman MB, Limberger RJ. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Res Microbiol* [Internet]. [cited 2018 Sep 22];143(6):597–603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1475520>
40. Wunder EA, Figueira CP, Santos GR, Lourdault K, Matthias MA, Vinetz JM, et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. Palmer GH, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2016 Jul [cited 2018 Sep 22];84(7):2105–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141082>

41. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, et al. LfhA, a Novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2018 Sep 22];74(5):2659–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622202>
42. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition. *Infect Immun* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2018 Sep 22];75(6):2864–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371863>
43. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost M-C, Lilenbaum W, et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2018 Sep 22];154(5):1309–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451039>
44. Lingappa J, Kuffner T, Tappero J, Whitworth W, Mize A, Kaiser R, et al. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene–environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. *Genes Immun* [Internet]. 2004 May 11 [cited 2018 Sep 22];5(3):197–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014429>
45. Pereira MM, Da Silva JJP, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, Lenzi HL, et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2005 Jan [cited 2018 Sep 22];72(1):13–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728860>
46. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol* [Internet]. 1991 Oct [cited 2018 Sep 22];173(19):6101–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1917844>
47. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1987 Oct 1 [cited 2018 Sep 22];37(4):407–15. Available from: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-37-4-407>
48. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2017 Aug 27];49(2):839–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319510>
49. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang Y-F, Zhang Y, Jiang X, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2018 Sep 22];6(1):20020. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep20020>

50. Llanes A, Restrepo CM, Rajeev S. Whole Genome Sequencing Allows Better Understanding of the Evolutionary History of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. Stevenson B, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Jul 21 [cited 2018 Sep 22];11(7):e0159387. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159387>
51. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003;422(6934):888–93.
52. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):1–57.
53. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. In: *Current topics in microbiology and immunology* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 27]. p. 65–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388133>
54. Terpstra W. *Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Ser Manuales Tec 12. 2008;127.
55. Barragan V, Nieto N, Keim P, Pearson T. Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. *BMC Res Notes* [Internet]. 2017;10(1):71. Available from: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2384-4>
56. Llanco Albornoz LA, Llanco Albornoz LA. Seroprevalencia y riesgo de infección de leptospirosis bovina en una localidad de costa y otra de sierra. Repos Tesis - UNMSM [Internet]. 2016 [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4960>
57. Levett PN. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2018 Sep 22];36(4):447–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567302>
58. Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1999 Nov [cited 2018 Sep 22];61(5):731–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586903>
59. Galloway RL, Levett PN. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Apr [cited 2018 Sep 23];78(4):628–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385360>
60. Vargas E. Situación de la leptospirosis en el Perú, años 2013–2014 (a la SE-19). *Boletín Epidemiológico (Lima)* [Internet]. 2014;23(19):382–5. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/19.pdf>

61. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection [Internet]. Vol. 68, INFECTION AND IMMUNITY. 2000 [cited 2018 Nov 8]. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Strains.html>,
62. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons I Saint. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219–24.
63. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2017 Nov 16];33(7):1870–4. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msw054>
64. Belkum A Van, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2007;13:1–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>
65. Pinto PS, Libonati H, Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2017;49(2):231–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-016-1201-8>
66. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. Animal leptospirosis in Latin America and the caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002–2014). *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(10):10770–89.
67. Céspedes M, Chun M, Cano E, Huaranca I, Atoche H. EN PERSONAS ASINTOMÁTICAS Y EN PERROS DE CHANCAY , LIMA 2001 persons and dogs in Chancay , Lima 2001. 2007;24(4):343–50.
68. Céspedes (2007) - Leptospirosis en Ucayali.
69. Cruz-Romero A, Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Alvarado-Félix ÁO, Sánchez-Montes S, Hernández-Tinoco J, et al. Seroepidemiology of *Leptospira* infection in backyard pigs in Durango State, Mexico. *Eur J Microbiol Immunol* [Internet]. 2018;1–4. Available from: <https://www.akademai.com/doi/10.1556/1886.2018.00009>
70. Calderón A, Rodríguez V, Máttar S, Arrieta G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*. 2014;46(2):427–32.
71. Miraglia F, Moreno AM, Gomes CR, Paixão R, Liuson E, Morais ZM, et al. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2008;39(3):501–7.
72. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE.

- Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: A maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(10):1305–9.
73. Miotto BA, Moreno LZ, Guilloux AGA, Sousa GO de, Loureiro AP, Moreno AM, et al. Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. *Acta Trop* [Internet]. 2016;162:1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.007>
 74. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 2003;222(9):1230–3. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2003.222.1230>
 75. Romero-Vivas CME, Cuello-Pérez M, Agudelo-Flórez P, Thiry D, Levett PN, Falconar AKI. Cross-sectional study of *Leptospira* seroprevalence in humans, rats, mice, and dogs in a main tropical sea-port city. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(1):178–83.
 76. Miotto BA, Guilloux AGA, Tozzi BF, Moreno LZ, Da Hora AS, Dias RA, et al. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS One*. 2018;13(7):1–23.
 77. Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63(5–6):255–8.
 78. Eca Avila A. EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE *Leptospira* spp. PATÓGENA EN MUESTRAS DE RESERVORIOS DE BELÉN-IQUITOS. Tesis de Postgrado. 2018;
 79. Pijnacker R, Goris MGA, te Wierik MJM, Broens EM, van der Giessen JWB, de Rosa M, et al. Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Apr 28 [cited 2017 Aug 23];21(17):30211. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168584>
 80. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005;54(1):45–9.
 81. Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS One*. 2011;6(1):1–6.
 82. Barragan V, Olivas S, Keim P, Pearson T. Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira*

- spp. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2018 Aug 27];83(19):e01190-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754706>
83. Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstreae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(PART 5):1859–62.
 84. Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, et al. Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3).
 85. Matthias M a, Díaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, Pacheco V, et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5):964–74.
 86. Rivera P, Ticlla M, Balda L, Gonzalez D, Céspedes M. Diversidad genética de aislamientos peruanos de *Leptospira* spp. mediante electroforesis en gel de campo pulsado. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 Jan 18];29(4):469–76. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000400008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 87. Tulsiani SM, Craig SB, Graham GC, Cobbold RC, Dohnt MF, Burns M-A, et al. High-resolution melt-curve analysis of random-amplified-polymorphic-DNA markers, for the characterisation of pathogenic *Leptospira*. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2010 Mar 18 [cited 2018 Mar 5];104(2):151–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406582>
 88. Naze F, Desvars A, Picardeau M, Bourhy P, Michault A. Use of a new high resolution melting method for genotyping pathogenic leptospira spp. *PLoS One*. 2015;10(7):1–15.
 89. Cai CS, Zhu YZ, Zhong Y, Xin XF, Jiang XG, Lou XL, et al. Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of leptospira in China. *BMC Microbiol*. 2010;10:2–7.
 90. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* [Internet]. 1991 May [cited 2018 Aug 14];44(5):360–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646235>
 91. Hidalgo AH y JuL de. *Leptospirosis en el Peru I*. 1958.
 92. Pereira MM, Schneider MC, Munoz-zanzi C, Costa F, Benschop J, Hartskeerl R, et al. A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin America. 2017;1–9.
 93. Dufour B, Moutou F, Hattenberger AM, Rodhain F. Global change: impact,

management, risk approach and health measures – the case of Europe. Rev sci tech Off int Epiz [Internet]. 2008 [cited 2017 Aug 23];27(2):541–50. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/2c3e/dbe7f417b94d44e6f5c8e8f4f9294c0825be.pdf>

XII. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la PCR en tiempo real del gen GAPDH de perro

Código	Cq	Tm (°C)	Código	Cq	Tm (°C)
P-01	27.11	79	LB/P-28	27.12	79
P-02	28.28	79	LB/P-29	28.73	79
P-03	28.76	79	LB/P-30	26.755	79
P-04	29.51	79	LB/P-31	32.46	79.5
P-05	27.8	79	LB/P-32	31.8	79.5
P-07	24.93	79	LB/P-33	27.59	79
P-08	33.22	79.5	LB/P-34	26.88	79
P-09	25.41	79	LB/P-35	29.215	79
P-10	24.66	79	LB/P-36	32.92	79.5
P-11	26.38	79	LB/P-37	25.19	79
P-12	33.63	79	LB/P-38	27.45	79
P-13	29.61	79	LB/P-39	22.26	79
LB/P-14	26.77	79	LB/P-40	28.99	79
LB/P-15	24.44	79	LB/P-41	26.46	79
LB/P-16	33.32	79.5	LB/P-42	28.05	79
LB/P-17	28.3	79	LB/P-43	25.59	79
LB/P-18	28.29	79	LB/P-44	27.66	79
LB/P-19	21.3	79	LB/P-45	27.24	79
LB/P-20	35.3	79.5	LB/P-46	33.12	79
LB/P-21	29.55	79	LB/P-47	31.29	79.5
LB/P-22	27.97	79	LB/P-48	28.08	79
LB/P-23	29.51	79	LB/P-49	33.07	79.5
LB/P-24	28.04	79	LB/P-50	23.82	79
LB/P-25	27.72	79	LB/P-51	28.16	79
LB/P-26	33.44	79.5	LB/P-52	21.91	78.5
LB/P-27	21.065	79	LB/P-53	19.58	78.5

Código	Cq	Tm (°C)	Código	Cq	Tm (°C)
LB/P-54	28.18	79	LB/P-85	37.85	80
LB/P-55	31.17	79	LB/P-86	26.63	79
LB/P-56	26.7	79	LB/P-88	28.67	79.5
LB/P-57	26.23	79.5	LB/P-90	26.38	79.5
LB/P-58	23.49	78.5	LB/P-93	22.26	79.5
LB/P-59	27.02	79	LB/P-94	27.76	79.5
LB/P-60	28.47	79	LB/P-99	24.39	79
LB/P-61	27.55	79	LB/P-101	29.28	79
LB/P-62	24.6	79	LB/P-105	26.105	79
LB/P-63	30.46	79	LB/P-107	29.16	79
LB/P-64	24.98	79	LB/P-108	25.15	79.5
LB/P-65	27.09	79	LB/P-109	23.54	79
LB/P-66	26.6	79	LB/P-110	28.56	79.5
LB/P-67	27.82	79	LB/P-114	27.42	79.5
LB/P-68	26.32	79.5	LB/P-115	26.59	79.5
LB/P-69	19.445	79	LB/P-116	26.25	79.5
LB/P-70	28.475	79	LB/P-117	23.46	79.5
LB/P-71	25	79.5	LB/P-119	24.44	79.5
LB/P-72	29.45	79.5	LB/P-120	33.25	79.5
LB/P-73	23.43	79.5	LB/P-123	24.89	79.5
LB/P-74	21.35	79.5	LB/P-126	24.28	79.5
LB/P-75	24.45	79.5	LB/P-131	33.22	79.5
LB/P-76	26.53	79.5	LB/P-133	30.13	79.5
LB/P-77	23.64	79.5	LB/P-135	38.18	79.5
LB/P-79	23.61	79	LB/P-136	33.2	79.5
LB/P-80	30.18	79.5	LB/P-140	36.66	79.5
LB/P-81	27.36	79.5	LB/P-142	23.62	79.5
LB/P-82	26.83	79.5	LB/P-144	34.04	79.5
LB/P-83	28.83	79.5	LB/P-148	31.345	79.5
LB/P-84	22.86	79.5	LB/P-149	26.5	79

Código	Cq	Tm (°C)
LB/P-150	27.41	79.5
LB/P-151	26.35	79.5
LB/P-152	31.18	79.5
LB/P-153	25.71	79.5
LB/P-154	30.68	79.5
LB/P-157	27.29	79.5
LB/P-162	28.13	79.5
LB/P-164	31.66	79
LB/P-166	38.09	80
LB/P-167	24.86	79
LB/P-168	24.86	79.5
LB/P-170	23.69	79.5
LB/P-171	27.44	79.5
LB/P-172	28.12	80
LB/P-173	37.45	80

Anexo 2. Resultados de la PCR en tiempo real del gen GAPDH de cerdo

Código	Cq	Tm (°C)	Código	Cq	Tm (°C)
LB/C-01	27.28	84	LB/C-38	30.12	83.5
LB/C-02	25.99	84	LB/C-40	30.38	83.5
LB/C-03	26.68	84	LB/C-41	30.39	83.5
LB/C-06	33.13	83.5	LB/C-42	26.17	83.5
LB/C-07	28.76	83.5	LB/C-43	27.35	83.5
LB/C-08	36.17	83.5	LB/C-44	29.34	83.5
LB/C-09	30.99	83.5	LB/C-45	28.44	83.5
LB/C-11	28.17	83.5	LB/C-47	29.2	83.5
LB/C-12	29.04	83.5	LB/C-48	32.43	83.5
LB/C-13	24.87	83.5	LB/C-49	27.64	83.5
LB/C-14	26.68	83.5	LB/C-50	29.03	83.5
LB/C-15	27.81	83.5	LB/C-51	31.23	83.5
LB/C-16	24.34	84	LB/C-63	31.14	83.5
LB/C-17	28.48	83.5	LB/C-64	32.21	83.5
LB/C-18	23.31	84	LB/C-65	30.41	83.5
LB/C-19	33.42	83.5	LB/C-66	31.08	83.5
LB/C-21	26.99	84	LB/C-67	27.67	83.5
LB/C-22	27.29	83.5	LB/C-68	25.03	84
LB/C-23	27.02	83.5	LB/C-69	32.21	84
LB/C-24	27.9	83.5	LB/C-70	23	84
LB/C-25	25.84	83.5	LB/C-71	32.09	83.5
LB/C-26	28.66	83.5	LB/C-72	26.21	83.5
LB/C-27	29.01	83.5	LB/C-73	31.7	84
LB/C-28	22.8	83.5	LB/C-80	25.29	83.5
LB/C-30	28.43	84	LB/C-81	28.59	83.5
LB/C-31	30.26	83.5	LB/C-82	24.86	84
LB/C-34	30.47	83.5	LB/C-83	25.77	83.5
LB/C-35	26.08	83.5	LB/C-84	28.05	83.5
LB/C-36	23.28	84	LB/C-85	29.12	83.5
LB/C-37	29.46	83.5	LB/C-86	27.82	83.5

Código	Cq	Tm (°C)	Código	Cq	Tm (°C)
LB/C-87	28.1	83.5	LB/C-129	28.49	83.5
LB/C-88	23.61	84	LB/C-134	33	83.5
LB/C-94	27.82	83.5	LB/C-135	27.43	83.5
LB/C-95	22.635	83.5	LB/C-138	32.05	83.5
LB/C-98	29.13	84	LB/C-139	31.58	83.5
LB/C-99	26.69	83.5	LB/C-140	31.09	83.5
LB/C-100	31	83.5	LB/C-144	28.18	83.5
LB/C-101	29.18	84	LB/C-146	30.02	83.5
LB/C-102	28.89	83.5	LB/C-147	33.35	83.5
LB/C-103	26.66	83.5	LB/C-148	31.02	83.5
LB/C-104	28.41	83.5	LB/C-149	30.395	83.5
LB/C-105	26.11	83.5	LB/C-150	30.26	83.5
LB/C-109	27.21	83.5	LB/C-151	27.79	83.5
LB/C-110	27.42	83.5	LB/C-152	30.7	83.5
LB/C-111	27.73	83.5	LB/C-153	32.35	83.5
LB/C-112	25.43	84	LB/C-154	37.53	83.5
LB/C-113	29.56	84	LB/C-156	34.29	83.5
LB/C-114	25.435	83.5	LB/C-157	30.56	83.5
LB/C-115	28.46	83.5	LB/C-158	29.055	83.5
LB/C-116	26.74	84	LB/C-159	30.98	84
LB/C-118	35.18	83.5	LB/C-167	29.39	83.5
LB/C-119	22.7	83.5	LB/C-168	22.85	84
LB/C-121	25.4	83.5	LB/C-169	26.62	84
LB/C-122	31.81	83.5	LB/C-170	24.7	84
LB/C-123	30.185	83.5	LB/C-171	27.19	84
LB/C-124	34.27	83.5	LB/C-172	26.23	83.5
LB/C-125	34.07	83.5	LB/C-173	25.875	83.5
LB/C-126	34.36	83.5	LB/C-174	26.28	83
LB/C-127	27.47	83.5	LB/C-180	29.28	84
LB/C-128	37.2	83.5	LB/C-181	28.64	84

Código	Cq^a	Tm (°C)
LB/C-182	27.06	83.5
LB/C-183	30.01	84
LB/C-184	24.12	83.5