



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Leptospira* EN AGUAS SUPERFICIALES DE
ZONAS ENDÉMICAS DE LEPTOSPIROSIS 2019 Y 2022

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Condori Chorres, Daniela Alejandra

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Robles Román, Margarita Elena

Sáez Flores, Gloria María

Cuya Briones, Miryan Rebeca

Lima - Perú

2024



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Leptospira* EN AGUAS SUPERFICIALES DE ZONAS ENDÉMICAS DE LEPTOSPIROSIS 2019 Y 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

22%

INDICE DE SIMILITUD

21%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	riul.unanleon.edu.ni:8080 Fuente de Internet	2%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	docplayer.es Fuente de Internet	1%
4	repository.lasalle.edu.co Fuente de Internet	1%
5	www.engormix.com Fuente de Internet	1%
6	www.medigraphic.com Fuente de Internet	1%
7	repository.ces.edu.co Fuente de Internet	1%
8	repositorio.inta.gob.ar Fuente de Internet	1%



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Leptospira* EN AGUAS SUPERFICIALES DE ZONAS ENDÉMICAS DE LEPTOSPIROSIS 2019 Y 2022

Línea de investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autor:

Condori Chorres, Daniela Alejandra

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Robles Román, Margarita Elena
Sáez Flores, Gloria María
Cuya Briones, Miryan Rebeca

Lima - Perú

2024

DEDICATORIA

El siguiente trabajo de investigación se lo quiero dedicar, en primer lugar, a Dios, por darme la oportunidad de culminar con éxito cada una de las etapas de mi estudio y por darme la fortaleza y perseverancia para culminar este trabajo.

A mis padres Victoria y Samuel, y a mi hermana, por darme siempre su apoyo incondicional en todo momento y aconsejarme para culminar cada una de las etapas de mis estudios con éxito.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser el principal motor de mi vida y mi mayor inspiración.

A mis padres Victoria Chorres y Samuel Condori, por todo su apoyo, amor, comprensión y confianza que depositaron en mí, y por acompañarme durante los momentos más difíciles.

A mi hermana Sandra Condori, por ser mi apoyo en todo momento, y mi sobrino Gabriel, por su amor.

A la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional Federico Villarreal, a sus profesores, por todas las enseñanzas brindadas, y demás administrativos de la institución.

Al Blgo. John Calderón y la Dra. Giovanna Mendoza por la oportunidad de realizar mi pasantía y trabajo de grado en las instalaciones del Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas del Instituto Nacional de Salud (INS).

A mis asesores, la Blga. Angélica Delgado y el Blgo. Ramsés Salas, por compartir conmigo todos sus conocimientos, por la asesoría y acompañamiento durante todas las fases de mi trabajo de grado.

Al Blgo. Marco Galarza por ser la persona principal que confió en mí y me brindó la oportunidad de realizar mi trabajo de grado, y me acompañó durante todo este trabajo de tesis.

A cada uno de mis compañeros, miembros del equipo de laboratorio de Zoonosis Bacterianas, y mis grandes amigos Blgo. Giovanni Vilcarino y Tec. Lab. Fanny Valverde que me aportaron con su acompañamiento, apoyo y dedicación durante mi trabajo de grado.

A mis amigas Solange y Andrea, que me brindaron su apoyo y amistad sincera durante la carrera y mucho más después de ella, y que hasta hoy perdura.

A mis mascotas “Nikita” y “Kayser”, que estando en vida, fueron fieles compañeros en las noches de desvelo durante la carrera y me brindaron su apoyo en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Descripción de la formulación del problema	3
1.2 Antecedentes	6
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos	12
1.4 Justificación	12
1.5 Hipótesis	14
II MARCO TEÓRICO	15
2.1 Agente etiológico: <i>Leptospira</i> spp.	15
2.1.1 Características morfológicas.....	15
2.1.2 Características fisiológicas.....	17
2.1.3 Características genómicas.....	17
2.1.4 Clasificación taxonómica y nomenclatura.....	18
2.2 Leptospirosis	20
2.2.1 Fuente de infección	20
2.2.2 Transmisión	21

2.2.3	Manifestaciones clínicas.....	22
2.3	Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	23
2.3.1	Prueba de cultivo.....	23
2.3.2	Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
2.3.3	Prueba de Microaglutinación (MAT).....	24
2.3.4	Secuenciamiento del gen ARNr 16S.....	25
2.4	Epidemiología.....	26
2.5	Tratamiento.....	26
III.	MÉTODO.....	28
3.1	Tipo de investigación.....	28
3.2	Ámbito temporal y espacial.....	28
3.3	Variables.....	28
3.4	Población y muestra.....	28
3.4.1	Población.....	28
3.4.2	Muestra.....	28
3.5	Instrumentos.....	29
3.5.1	Equipos de laboratorio.....	29
3.5.2	Materiales de Laboratorio.....	30
3.5.3	Materiales biológicos.....	31
3.5.4	Reactivos.....	31

3.6	Procedimiento	32
3.6.1	Reactivación de aislamientos de <i>Leptospira</i> spp.	32
3.6.2	Prueba de Microaglutinación para tipificación de serovares de <i>Leptospira</i> spp.	32
3.6.3	Extracción de ADN	33
3.6.4	Amplificación mediante la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) 34	
3.6.5	Electroforesis de gel de agarosa	35
3.6.6	Purificación.....	35
3.6.7	Cuantificación de los productos purificado.....	35
3.6.8	Electroforesis del producto de amplificación purificado	36
3.6.9	Reacción de secuenciación	36
3.6.10	Purificación por columnas.....	37
3.7	Análisis de datos	37
IV.	RESULTADOS	38
3.8	Cultivo de aislamientos de leptospiras	39
3.9	Tipificación de serovares/serogrupos de <i>Leptospira</i> spp.	39
3.10	Evaluación de cepas por PCR	40
3.11	Secuenciamiento por Sanger	41
3.12	Análisis filogenético.....	43
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	45

VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS	50
IX. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Muestras de aguas superficiales provenientes de diferentes fuentes y zonas endémicas comprendidas en los años 2019 y 2022	29
Tabla 2 Mezcla de reacción de PCR	34
Tabla 3 Parámetros de Amplificación	35
Tabla 4 Mezcla de Reacción de Secuenciación	36
Tabla 5 Parámetros de Ciclaje de secuenciación	37
Tabla 6 Códigos usados para cada una de las muestras	38
Tabla 7 Aislamientos de <i>Leptospira</i> spp. procedentes de muestras de agua de zonas endémicas que reaccionaron frente a antisueros referenciales serogrupos/serovares	40
Tabla 8 Electroforesis del PCR convencional de los 32 aislamientos de <i>Leptospira</i> spp. a partir de la vigilancia de zonas endémicas de los años 2019 y 2022	42
Tabla 9 Resultados del análisis BLASTn de las secuencias del gen 16S ARNr amplificadas a partir de cada aislado ambiental del 2022	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Imagen de un cultivo puro de <i>Leptospira</i> spp. aplicando inmunofluorescencia directa (IFD) (200X).....	15
Figura 2 Imagen obtenida a través de microscopia electrónica de barrido de <i>Leptospira interrogans</i> cepa RGA	16
Figura 3 Imagen de la estructura de la pared celular de <i>Leptospira</i> spp.....	17
Figura 4 Filogenia del género <i>Leptospira</i> spp.....	19
Figura 5 Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT)	32
Figura 6 Serovares de referencia usados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT).....	33
Figura 7 Espiroquetas observadas mediante microscopia directa por campo oscuro (objetivo 40X).....	39
Figura 8 Electroforesis del PCR convencional de los 32 aislamientos de <i>Leptospira</i> spp. a partir de la vigilancia de zonas endémicas de los años 2019 y 2022	41
Figura 9 Árbol filogenético de Máxima parsimonia de secuencias parciales de 16S ARNr de <i>Leptospira</i> spp. aisladas de muestras de aguas superficiales.....	44

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana reconocida como infecciosa y desatendida, con impacto significativo en áreas urbanas y rurales. Este estudio tuvo como objetivo identificar especies de *Leptospira* spp. en aguas superficiales de zonas endémicas entre 2019 y 2022. Se realizó un estudio descriptivo, longitudinal y retrospectivo con 32 aislamientos de *Leptospira* spp. de fuentes de agua en departamentos endémicos. La identificación se llevó a cabo mediante secuenciación Sanger del gen ARNr 16S. Se identificaron especies patógenas como *Leptospira interrogans* en Piura (2022); especies intermedias como *Leptospira venezuelensis* en Loreto (2019) y Jaén (2022); *Leptospira wolffii* en Madre de Dios, San Martín (2019) y Loreto (2022); y *Leptospira selangorensis* en Madre de Dios (2019). Entre las especies saprófitas, se hallaron *Leptospira meyeri* en Loreto (2019); *Leptospira jelokensis* en Ucayali y Loreto (2019) y Jaén (2022); y *Leptospira biflexa* en Madre de Dios (2019), Loreto y Jaén (2022). El clado patógeno predominó en 2022, asociado a mayor probabilidad de enfermedad en humanos y animales. Las *Leptospira* spp. fueron halladas principalmente en ríos y quebradas, fuentes clave para uso laboral y doméstico, representando un riesgo potencial de infección. Este estudio resalta la necesidad de monitoreo constante de *Leptospira* spp. en aguas superficiales para prevenir brotes de leptospirosis.

Palabras clave: *Leptospira* spp., ARNr16S, especies, aguas superficiales

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease recognized as an infectious and neglected condition, with a significant impact on urban and rural areas. This study aimed to identify *Leptospira* spp. species in surface waters from endemic areas between 2019 and 2022. It was a descriptive, longitudinal, and retrospective study involving 32 isolates of *Leptospira* spp. from water sources in endemic regions. Species identification was performed using Sanger sequencing of the 16S rRNA gene. Pathogenic species such as *Leptospira interrogans* were identified in samples from Piura (2022). Intermediate species included *Leptospira venezuelensis* in Loreto (2019) and Jaén (2022); *Leptospira wolffii* in Madre de Dios, San Martín (2019), and Loreto (2022); and *Leptospira selangorensis* in Madre de Dios (2019). Saprophytic species identified included *Leptospira meyeri* in Loreto (2019); *Leptospira jelokensis* in Ucayali and Loreto (2019) and Jaén (2022); and *Leptospira biflexa* in Madre de Dios (2019), Loreto, and Jaén (2022). The pathogenic clade was predominant in 2022, associated with a higher likelihood of causing disease in humans and animals. *Leptospira* spp. were primarily found in rivers and streams, key sources for labor and domestic use, posing a potential risk of infection. This study highlights the need for continuous monitoring of *Leptospira* spp. in surface waters to prevent leptospirosis outbreaks.

Keywords: *Leptospira* spp., rRNA16S, species, surface Waters

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción de la formulación del problema

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y desatendida causada por la bacteria del género *Leptospira* spp. Actualmente es reconocida como una zoonosis bacteriana y se ha convertido en una de las causantes de morbilidad y mortalidad, donde las poblaciones empobrecidas son las más afectadas (Levett, 2001a). Se presenta en la mayoría de grupos poblacionales que trabajen o viven en condiciones de escasos recursos, que no presenten saneamiento básico y estén expuestos al contagio de fuentes de aguas o suelos contaminados con orina infectada con *Leptospira* spp. de algún mamífero doméstico o silvestre, principalmente roedores (Laplume et al., 2014). También influye el factor climático, donde la leptospirosis presenta una dispersión más favorable en regiones tropicales y sub – tropicales (MINSA, 2012a).

Las leptospiras presentan una mayor supervivencia en el agua, si el pH es de 7,2 a 8,0. Se adaptan a temperatura ambiente y pueden sobrevivir en aguas superficiales hasta 183 días. La supervivencia del patógeno es más prolongada en agua estancada que en agua corriente, convirtiéndose en el medio más común de transmisión para el humano, afectando principalmente a deportistas y excursionistas que acampan o se bañan en lugares contaminados (Arencibia et al., 2021).

El suelo, es otro medio común de transmisión para el humano, donde las leptospiras pueden sobrevivir hasta 15 días en suelos contaminados con orina de reservorios (Céspedes, 2005a). Asimismo, la lluvia aumenta la capacidad de supervivencia colaborando con la posible diseminación y multiplicación de leptospiras en el ambiente (suelo) hacia las aguas superficiales (Trueba et al., 2002). La exposición a la leptospirosis también se produce a través del contacto con mascotas como perros, ganado doméstico y mamíferos pequeños como ratas o ratones infectados con la bacteria (Lozano et al., 2010; Martone y Kaufmann, 1979).

El género *Leptospira* tradicionalmente presenta dos grupos taxonómicos: patógenos (*Leptospira interrogans*) y saprófitos (*Leptospira biflexa*), que a su vez, se dividieron en más de 250 serovares según la prueba de aglutinación cruzada (CAAT) (Levett, 2001a). La unidad taxonómica de *Leptospira* spp. es el serovar (Gillespie, 2016), y estos al estar antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos (Levett, 2001a). Según su clasificación genotípica, existen tres subgrupos de *Leptospira* spp.: “patógenas”, “saprófitas” e “intermedias”. Especies patógenas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. alstoni*, *L. kmetyi* y *L. mayottensis*; todas estas especies se caracterizan porque causan enfermedades en animales y humanos. Especies intermedias: *L. licerasiae*, *L. venezuelensis*, *L. wolffii*, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. broomii*; estas especies recientemente fueron descritas en animales y en los seres humanos, están más relacionadas con las especies patógenas que con las especies saprófitas y su patogenicidad está en estudio (Lopardo et al., 2021). Las especies saprófitas se caracterizan por ser ambientales, es por eso que pueden crecer en modelos animales rápidamente y no causan ninguna enfermedad en los seres humanos y animales (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. idonii*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. yanagawae*).

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis pueden variar, ya que pueden presentarse como una enfermedad similar a la gripe de intensidad leve o como una enfermedad potencialmente mortal. En muchos casos, la leptospirosis puede desarrollarse de manera asintomática, ya que la mayoría de las infecciones no muestran signos clínicos evidentes, siendo demasiado leves para un diagnóstico definitivo (Benenson, 1993). La confirmación de los casos requiere pruebas de laboratorio, dado que a menudo se diagnostica incorrectamente y puede ser confundida con otras enfermedades febriles, especialmente con fiebres hemorrágicas virales como el dengue, la malaria, la fiebre amarilla, debido a la falta de información, conciencia y reconocimiento de un uso adecuado de las herramientas de

diagnóstico (Céspedes, 2005). El diagnóstico de la leptospirosis es complicado debido a la ausencia de síntomas específicos, lo que dificulta la realización e interpretación de los métodos de referencia basados en cultivos bacterianos, técnicas serológicas o diagnóstico molecular (Levett, 2001).

Los métodos moleculares, como la prueba de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizan secuencias específicas de ADN bacteriano para distinguir entre las especies patógenas y no patógenas de *Leptospira* spp. El uso de la PCR en *Leptospira* spp. ha sido estudiada con el objetivo de diferenciar entre cepas saprófitas y patógenas, así como para su uso en estudios epidemiológicos, donde contribuye de manera significativa al determinar la identidad de las cepas en circulación (Hernández-Rodríguez et al., 2011). Una limitante en el diagnóstico de leptospirosis mediante la prueba de PCR, en la mayoría de los casos, es la incapacidad de identificar el serovar responsable de la infección. En contraste con otros métodos, las pruebas moleculares indican la presencia actual del agente en una muestra biológica, especialmente con fines clínicos (Ahmad et al., 2005). La identificación molecular y discriminación de las especies de leptospirosis en los grupos de patógenos, intermedios o saprófitos permitirá un tratamiento con antibióticos más preciso. Aunque la identificación del serovar de cada cepa aislada puede no tener relevancia aparente para un paciente, posee un valor epidemiológico significativo para la salud pública, ya que ciertos serovares pueden establecer relaciones comensales o mostrar una patogenicidad leve con especies animales específicas. En este estudio en particular, se identificó los serogrupos/serovares a través de la prueba de microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés) y especies mediante la secuenciación del gen ARNr 16S del género *Leptospira* spp. presentes en diversas fuentes de aguas superficiales en áreas endémicas del Perú durante los últimos años 2019 y 2022.

Por tanto, en el presente proyecto se desea formular la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los serogrupos/serovares y especies de *Leptospira* presentes en aguas superficiales de zonas endémicas, durante los años 2019 y 2022?

1.2 Antecedentes

En un estudio realizado en Malasia en 2017 por Pui y colaboradores, utilizaron la PCR para detectar *Leptospira* spp. en ratas, suelo y agua de áreas urbanas. Recolectaron un total de 107 muestras de ratas, 292 muestras de suelo y 324 muestras de agua, entre los meses de abril del 2014 y febrero del 2015. La PCR detectó *Leptospira* patógena en el 5,6% (6/107) de las muestras de ratas, el 11,6% (34/292) de las muestras de suelo y 1,9% (6/324) de muestras de agua. También se detectó *Leptospira* intermedia, en un 2,7% (8/292) de las muestras de suelo y en el 1,9% (6/324) de las muestras de agua. Y por último se detectó *Leptospira* saprófita, presente un 10,3% (11/107) de las ratas, el 1,4% (4/292) de las muestras de suelo y el 0,3% (1/324) de las muestras de agua. Este estudio indica que se realizó secuenciamiento a setenta y seis especies de *Leptospira* spp., hallándose: *Leptospira noguchii* patógena 6,4% (46/723), *Leptospira wolffii* intermedia serovar Khorat 1,9% (14/723) y *Leptospira meyeri* saprófita 2,2% (16/723). Estos resultados aportaron importantes datos de vigilancia sobre la prevalencia local de serovares de *Leptospira* spp. y ayudaron a comprender la importancia de sus reservorios para una comprensión epidemiológica de la enfermedad en la región (Pui et al., 2017).

En el 2018, en Buenos Aires, Argentina, Scialfa y colaboradores pudieron aislar diez cepas de *Leptospira* spp. a partir de muestras de agua de un arroyo. Al examinar estos aislamientos mediante microscopía de campo oscuro, se evidenció su motilidad y morfología característica del género *Leptospira* spp. Para su crecimiento y desarrollo, se empleó el medio líquido Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH, por sus

siglas). A pesar de que todos los aislamientos dieron resultado negativo en la prueba de análisis de múltiples loci variables (MLVA), y mediante secuenciamiento del gen ARNr 16S se identificó como *Leptospira* no patógenas. Cuatro de estos aislamientos mostraron un perfil genético idéntico a la cepa de referencia *Leptospira biflexa* serovar Patoc, mientras que los otros seis aislamientos presentaron similitudes de secuencias relacionadas con las especies *Leptospira yanagawae* y *Leptospira meyeri*, con un rango de similitud del 97 y 98%, respectivamente. Esto se demostró que el ambiente de estas muestras de agua, tuvieron condiciones óptimas de pH y temperatura para la supervivencia de la *Leptospira* spp. (Scialfa et al., 2018).

Zulkifli y colaboradores realizaron un estudio en Malasia en el año 2018, con el objetivo de identificar y analizar la dispersión de *Leptospira* spp. en muestras ambientales, usando el gen ARNr 16S y el gen *rpoβ* amplificados. Se recolectaron 105 muestras de suelo y agua de áreas de alto riesgo, las cuales se sometieron directamente a la extracción de ADN y amplificación por PCR. Los productos resultantes de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel y posteriormente se sometieron a análisis de secuencias. El 12,38% (13/105) mostraron amplificación para el gen ARNr 16S, con un tamaño de amplicón esperado (331 pb). Por otro lado, 47.62% (50/105) fueron amplificadas usando el gen *rpoβ* con un tamaño de amplicón de 400 pb en lugar del tamaño esperado de 600 pb. Las trece muestras del gen ARNr 16S amplificadas, solo se identificaron cinco como *Leptospira* spp. mediante el análisis de secuencia. Este estudio evidenció que la PCR y el análisis de secuencias son capaces de detectar la presencia de *Leptospira* spp, aunque las muestras ambientales pueden contener diversas poblaciones microbianas que pueden complicar su detección. En general, el estudio resaltó la importancia de la vigilancia para detectar la presencia y la distribución de *Leptospira* spp., amplificando los genes 16S rRNA y *rpoβ* de muestras ambientales (suelo y agua) recolectadas en zonas de alto riesgo en Selangor, Malasia. (Zulkifli et al., 2018).

En 2018, Mohd y su equipo llevaron a cabo un estudio en Malasia con el propósito de identificar la presencia de *Leptospira* spp. en zonas residenciales cuyos pacientes presentaron una tasa de positividad del 42,8% (18/42) a leptospirosis. Los resultados de los cultivos se recolectaron, cultivaron y procesaron muestras de suelo y agua en medios EMJH cerca de estas residencias. Luego se llevó a cabo el secuenciamiento parcial del gen ARNr 16S para confirmar la identificación de *Leptospira* spp. El análisis de cultivos y secuenciación se reveló un crecimiento predominante de patógenos *Leptospira kmetyi* 17% (7/42), seguido de cepas intermedias de *Leptospira wolffi* 7% (3/42), *Leptospira licerasiae* 5% (2/42) y otros saprófitos en menor frecuencia. En este estudio, se observó la presencia de más de una especie de *Leptospira* spp en el área de muestreo, siendo el aislamiento ambiental más común fue *Leptospira kmetyi* patógeno (Mohd et al., 2018).

Chaiwattananrungruengpaisan e investigadores en el 2018, realizaron un estudio en Tailandia, con el objetivo de investigar sobre la presencia de *Leptospira* patógenas en muestras de agua y suelo de una cascada. Se realizó el aislamiento mediante cultivo en medio EMJH, utilizando trece muestras de agua y cuatro muestras de suelo. Para la detección de agentes patógenos o intermedios, se amplificó del gen ARNr 16S parcial del ADN utilizando cebadores externos de un ensayo de PCR anteriormente publicado realizado por Sonthayanon et al., 2011. También mediante PCR específico se utilizó otro conjunto de cebadores del gen ARNr 16S diseñado por Thaipadungpanit et al., 2007 para amplificar el grupo saprófito. Se aisló un grupo diverso de especies de *Leptospira*: dos especies patógenas que incluyen *Leptospira alstonii* en un 29% (5/17) y *Leptospira kmetyi* en 6% (1/17); nueve especies intermedias *Leptospira wolffii* 53% (9/17) y dos especies no patógenas *Leptospira meyeri* en 6% (1/17) y *Leptospira idonii* en 6% (1/17). Con esto se dio a conocer sobre la prevalencia de *Leptospira* patógena e intermedia, lo que indica que una cascada también puede servir como reservorio natural de posibles patógenos de leptospirosis. (Chaiwattananrungruengpaisan et al., 2018).

En 2019, Masuzawa y su equipo llevaron a cabo un estudio en Japón basándose en datos previos donde se recopilaron un total de 132 muestras de suelo y agua, de las cuales 50 dieron positivas para *Leptospira*. Al realizar el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, se identificaron tres cepas denominadas: E8, E18 y YH101. Se descubrió que E8 pertenecía al clado de especies intermedias y que E18 y YH101 pertenecía a la *Leptospira* saprófita. Los resultados de este estudio revelaron información crucial sobre estas tres cepas, las cuales representan nuevas especies dentro del género *Leptospira* spp. Se les asignaron los nombres *Leptospira johnsonii* spp. nov (para la cepa E8), *Leptospira ellinghausenii* spp nov (para la cepa E18) y *Leptospira ryugenii* spp. nov (para la cepa YH101). Además, se demostró que estas tres cepas son compartían similitudes morfológicas a *Leptospira* spp., pero no infecciosas para ratones. En conclusión, se sugiere que las cepas E8, E18 y YH101 representan especies novedosas del género *Leptospira* spp., entonces se propone los nombres *L. johnsonii*, *L. ellinghausenii* y *L. ryugenii*, respectivamente. (Masuzawa et al., 2019).

En el año 2020, Ramírez García llevó a cabo un estudio en Antioquía, Colombia, con el propósito de detallar la diversidad genética de los patrones genómicos de *Leptospira* spp. presentes en muestras de hospederos susceptibles (humanos), hospederos sinantrópicos (roedores) y muestras ambientales (agua). La detección de la infección por leptospiras se realizó mediante amplificación, tanto con PCR convencional como con PCR en tiempo real, y las muestras fueron sometidas a secuenciación del gen ARNr 16S. Se analizaron 280 muestras de sangre y 256 de orina de humanos con síndrome febril agudo, 141 muestras de tejidos renales de hospederos sinantrópicos y 238 muestras de aguas domiciliarias. Los análisis moleculares dieron a conocer la frecuencia de infección por *Leptospira* spp. del 12,5% (35/280) en sangre humana, 10,93% (28/256) en orina humana, 9,21% (13/141) en tejidos renales de roedores y 7,14% (17/238) en muestras de agua. Se identificaron cinco especies de *Leptospira* spp. patógenas, a saber, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L.*

kirschneri, junto con diez genotipos distintos. Este estudio constituye la primera evidencia genómica en Colombia, utilizando la genotipificación como herramienta principal para analizar datos y caracterizar hasta el nivel de serotipo a los hospederos susceptibles, sinantrópicos y ambientales de *Leptospira* spp. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento de la transmisión de leptospirosis en una zona con alta incidencia y prevalencia de la enfermedad (Ramírez García, 2020).

El estudio realizado por Chaiwattananarungruengpaisan y colaboradores en un área de campamento de elefantes en el oeste de Tailandia en el año 2020, se recolectaron un total de veinticuatro muestras ambientales principalmente agua y suelo muestreados de un río y un estanque de lodo, que fueron cultivadas en medio EMJH. El 75% (18/24) fueron cultivos positivos a *Leptospira* spp., posteriormente se identificó a las especies de *Leptospira* spp. a través de la secuenciación parcial del gen ARNr 16S y *secY*. Se encontraron los aislados y se clasificaron en clado "patógenos" con el 89% (16/18) y en su mayoría especies del clado "saprofitas" con el 61% (11/18). Se encontró que dos aislamientos del suelo contenían ADN de leptospirosis con una gran similitud con los patógenos *L. interrogans* y *L. santarosai*. Este estudio dio como conclusión que alrededor del campamento de elefantes puede servir como fuente principal de infección y presentar riesgo para las personas que los visitan (Chaiwattananarungruengpaisan et al., 2020).

En Malasia, Zaki y colaboradores en el año 2020, realizaron un estudio para detectar y describir la distribución y prevalencia de leptospirosis patógenas en áreas recreativas. Se recolectaron al azar muestras de suelo y agua de treinta y tres áreas recreativas, desde diciembre de 2018 hasta abril de 2019. Se recogieron un total de 390 muestras entre agua y suelo, posteriormente fueron cultivadas y dieron positivo 131 cultivos para *Leptospira* spp. según la observación bajo microscopio de campo oscuro. Se identificó la presencia *Leptospira* spp. en

la mayoría de las áreas recreativas muestreadas y se aisló al menos una especie patógena de *Leptospira* en diecisiete áreas recreativas. La prevalencia de leptospirosis que pertenecen a los grupos: saprófitas, intermedias y patógenas, fueron 19,7%, 5,6% y 8,2%, respectivamente. La especie patógena dominante encontrada en las muestras fue *Leptospira kmetyi*. Este estudio proporcionó datos significativos sobre la distribución y prevalencia de *Leptospira* spp. en suelo y aguas, y también conocer a las especies patógenas dominantes en áreas recreativas (Zaki et al., 2020).

En un estudio Stone y colaboradores en Puerto Rico, EE. UU en el año 2022, recolectaron muestras ambientales de veintidós sitios durante tres períodos de muestreo en catorce meses. De cada lugar, se recolectaron diez muestras de agua y diez de suelo. Estas muestras fueron sometidas a análisis en busca de ADN de *Leptospira* patógena utilizando el ensayo de PCR *lipL32* y posteriormente se secuenciaron las muestras positivas para la evaluación de diversidad genética. Se obtuvo ADN patógeno de *Leptospira* en 15/22 sitios; tanto el suelo como el agua fueron positivos en 5/15 sitios. Se recuperaron secuencias *lipL32* de 83/86 muestras positivas (15/15 sitios positivos) y secuencias *secY* de 32/86 (10/15 sitios); se identificaron múltiples genotipos en 12 sitios. Las muestras positivas fueron secuenciadas y se identificaron seis muestras como *Leptospira* saprófitas y dos como patógenas; estas últimas representaron a una nueva especie patógena de *Leptospira* en la que probablemente sea un nuevo serogrupo. Este estudio se contribuye al entendimiento de la diversidad de *Leptospira* spp. en el ambiente y fortalece las prácticas de vigilancia. (Stone et al., 2022).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar las especies de *Leptospira* presentes en aguas superficiales de zonas endémicas de leptospirosis, durante los años 2019 y 2022.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar serogrupos/serovares de *Leptospira* spp. a través de la prueba de microaglutinación (MAT) en aislamientos de muestras de aguas superficiales.
- Detectar *Leptospira* spp. mediante la prueba del PCR convencional en aislamientos de muestras de aguas superficiales.
- Determinar especies de leptospirosis mediante el método de secuenciación del gen ARNr 16S para la identificación de especies del género *Leptospira*.
- Establecer la relación filogenética de *Leptospira* entre las especies identificadas de varias fuentes de agua durante los años 2019 y 2022.

1.4 Justificación

La leptospirosis, una enfermedad infecciosa y febril que afecta a mamíferos domésticos y silvestres, se presenta como una zoonosis infectocontagiosa de distribución mundial, siendo los animales la fuente de contagio para el hombre (Alonso-Andicoberry et al., 2022). Esta enfermedad es considerada como un importante problema de salud pública, demostrado por el incremento de brotes a nivel mundial (OMS, 2008a). El Perú es considerado un país endémico, especialmente en la región selva, donde a través del tiempo se han registrado brotes significativos en diversos departamentos como Madre de Dios, Ayacucho, Loreto, San Martín, Cusco, Ucayali, Piura, Cajamarca, Junín y Lima. La incidencia de la leptospirosis depende del riesgo laboral, actividades recreativas y factores ambientales, como el clima (templado, tropical y subtropical), el tipo de suelo y pH neutro o alcalino. La transmisión de *Leptospira* spp. también se produce a través de la aparición de esta bacteria en aguas infectadas con orina de

animales con leptospirosis, tanto domésticos como silvestres, principalmente de roedores que son reservorios predominantes y la principal fuente de contaminación para los humanos (López, 2015a).

La infección por leptospirosis en humano y animales puede ocurrir tanto de manera directa como, generalmente, de manera indirecta a través del contacto con agua y suelos contaminados por la orina de animales infectados con *Leptospira* spp. (Estrada, 2013a). La exposición al suelo o al agua que ha sido contaminada por la orina de animales reservorios, en su mayoría roedores infectados con *Leptospira* patógena, es la forma más frecuente de contraer leptospirosis tanto para humanos como para animales (Céspedes, 2005a).

El diagnóstico que comúnmente se usa para leptospirosis es microbiológico, serológico y molecular. La prueba microbiológica consiste en el cultivo de la *Leptospira* spp. en un medio selectivo denominado EMJH, con una incubación a 28-30°C. Debido a su lento desarrollo, el crecimiento se observa a partir de la primera semana, sin embargo, no se le considera negativo hasta después de dos meses como mínimo, por eso se considera un procedimiento que demanda mucho tiempo y es laborioso (Carrada-Bravo, 2005). El diagnóstico serológico, como la MAT, se considera una prueba de referencia, debido a su alta especificidad, pero sensibilidad variable según el número de serogrupos/serovares utilizados como antígeno. Además, permite identificar el o los serogrupos/serovares causantes de la infección. No obstante, la dificultad en el uso la prueba de MAT radica en el punto de corte de aglutinación de anticuerpos, siendo el más utilizado en 1:100 para hospederos susceptibles, aunque puede no siempre ser adecuado en poblaciones donde se presente alto o bajo porcentaje de endemidad de leptospirosis (Faine et al., 2000). Por otro lado, las técnicas moleculares como la PCR son las más utilizadas por su rapidez, sensibilidad y especificidad en la identificación de genes específicos de especies patógenas o especies específicas que causan enfermedad en estadios tempranos. Sin embargo, una de las limitaciones de la PCR en el diagnóstico de leptospirosis es la deficiencia de la

mayoría de las pruebas para identificar el serovar infectante. Aunque esto puede no ser crucial para el manejo individual del paciente, la identificación de serogrupos/serovares detectada por la prueba MAT es importante en salud pública y tiene un valor epidemiológico (Ahmad et al., 2005a).

Por otro lado, el desarrollo de herramientas genéticas como la secuenciación del gen ARNr 16S han dado lugar a importantes conocimientos sobre la taxonomía de estos microorganismos (Gamberini et al., 2005). En este contexto, en el presente estudio se identificaron diferentes especies del género de *Leptospira* spp., vinculadas a la transmisión de la leptospirosis en seres humanos a través del medio ambiente, específicamente del agua. Este análisis se realizó mediante la determinación de especies por secuenciación del gen ARNr 16S y serogrupos/serovares detectados por MAT. Este enfoque permite conocer la utilidad de la tipificación de los aislamientos para la vigilancia de las especies identificadas, así como la detección de nuevos patrones de presentación de la enfermedad y la evaluación de las intervenciones, como las vigilancias epidemiológicas. También, sirve para así poder controlar nuevos brotes a futuro, lo cual significa un importante aporte al conocimiento de la epidemiología para sugerir medidas preventivas y de control contra esta enfermedad.

1.5 Hipótesis

- Hipótesis alterna: Existen especies patogénicas de *Leptospira* spp. presentes en fuentes de aguas superficiales.
- Hipótesis nula: No existen especies patogénicas de *Leptospira* spp. presentes en fuentes de aguas superficiales.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Agente etiológico: *Leptospira* spp.

2.1.1 Características morfológicas

Las leptospiras se caracterizan por ser microorganismos que tienen forma delgada y espiralada, destacando especialmente por su capacidad de movimiento. A diferencia de otras espiroquetas, las leptospiras presentan ganchos en ambas terminaciones (Mohammed et al., 2011). Su diámetro aproximado es de 0.1 μm y su longitud oscila entre 6 y 20 μm (Terzolo y Catena, 2007).

La envoltura de las leptospiras es similar a la de las bacterias Gram negativas, que está compuesta por una membrana citoplasmática y una membrana externa. En este caso, la capa de peptidoglicano se relaciona con la membrana citoplasmática en lugar de hacerlo con la membrana externa, esto hace una característica única entre las espiroquetas (Faine, 1994; Levett, 2001). Además, poseen dos flagelos que se extienden desde los extremos opuestos del cuerpo citoplasmático a través del espacio periplasmático. Estos flagelos son responsables de la motilidad del microorganismo y facilitan su movimiento activo de rotación (Picardeau et al., 2001).

Las leptospiras son detectables mediante el uso de un microscopio de campo oscuro (Sandow y Ramírez, 2005), y también se pueden visualizar mediante técnicas como la inmunofluorescencia directa y la microscopía electrónica de barrido, como se muestran en las siguientes figuras:

Figura 1

Imagen de un cultivo puro de Leptospira spp. aplicando inmunofluorescencia directa (IFD) (200X). (Grune Loffler, 2022)

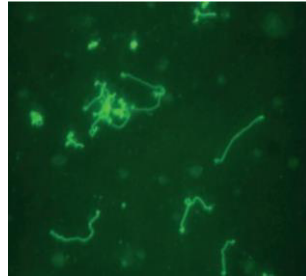
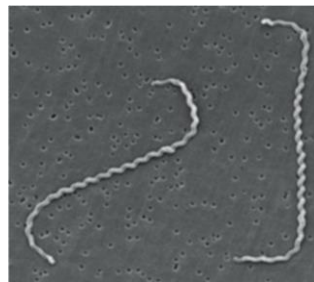


Figura 2

Imagen obtenida a través de microscopía electrónica de barrido de Leptospira interrogans cepa RGA (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010)

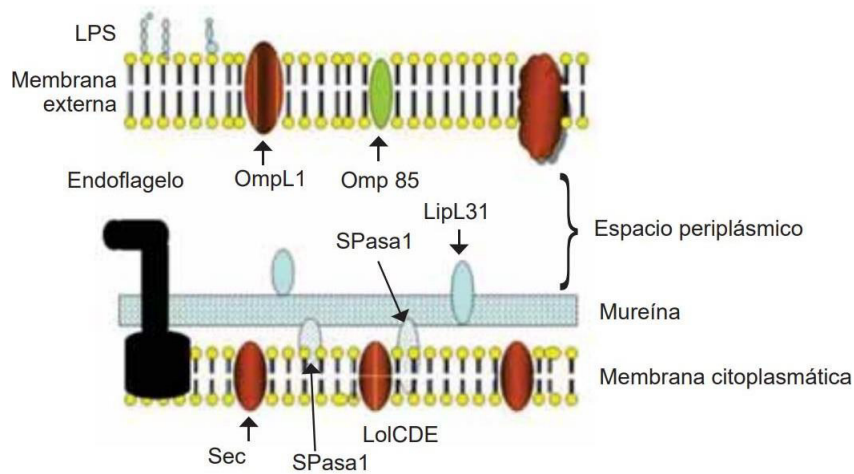


La membrana externa se caracteriza por ser multiestratificada y ser rica en lípidos (20%) y contiene lipopolisacáridos (LPS), estos últimos son los responsables de la especificidad de los serovares. Además, presentan diversas lipoproteínas (LipL32, LipL41) y porinas (OmpL1, OmpL85) que son altamente conservadas y desempeñan un papel crucial en la interacción con el hospedero, participando en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata. La membrana externa también incluye peptidoglicano y, en algunos casos, ácido α , β -diaminopilémico (Dong et al., 2008; Levett, 2001)

Por otro lado, la membrana interna está revestida por peptidoglicano y contiene lipoproteínas como Sec, SPasa I y II, LoICDE, así como el cuerpo basal del endoflagelo. Además, presenta un sistema de secreción tipo II que conecta ambas membranas (Ko et al., 2009).

Figura 3

Imagen de la estructura de la pared celular de Leptospira spp (Ko et al., 2009)



2.1.2 Características fisiológicas

La *Leptospira* spp. tiene como característica principal su capacidad de movimiento, gracias a la presencia de dos endoflagelos que poseen tres tipos de movimientos: rotación sobre su propio eje, movimientos progresivos rectos y movimientos circulares (Bharti et al., 2003). Es una bacteria aerobia obligada, catalasa y oxidasa positiva que crece y se desarrolla a una temperatura de 28 a 30°C en medios simples, que pueden ser enriquecidos con vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio durante el (Levett, 2001). Otra característica que presentan las leptospiras es de no multiplicarse fuera del hospedero, siendo altamente dependiente del entorno. Presentan vulnerabilidad a la desecación, pH por debajo de 6 o por encima de 8, y temperaturas fuera del rango de 10°C a 34°C (McDonough, 2001). La *Leptospira* spp. se encuentra en muestras clínicas como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y fluidos dializados, así como en muestras ambientales como suelos y aguas, siendo detectable mediante microscopia de campo oscuro e inmunofluorescencia directa. No obstante, su sensibilidad es baja, ya que solo se puede identificar cuando la concentración de leptospiras alcanza los 100 leptospiras/ml (Turner, 1970).

2.1.3 Características genómicas

Los primeros genomas de *Leptospira* spp. en ser secuenciados fueron los de *L. interrogans* serovar Lai (Ren et al., 2003) y *L. interrogans* serovar Copenhageni (Nascimento

et al., 2004). Según características genotípicas, la *Leptospira* spp. presenta un genoma compuesto por dos cromosomas circulares; uno de tamaño aproximado entre 3500 Kb y 4600 Kb, y otro más pequeño de 300 a 350 Kb (Picardeau, 2015). El análisis genómico de las tres especies de *Leptospira* spp (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. biflexa*) determina que los genes compartidos entre estas especies tienen un origen común tanto para la leptospiras patógenas como para las saprófitas (Picardeau et al., 2008). Según sus características genómicas, el subclado patógenas e intermedias son semejantes entre ellas, en comparación con el subclado saprófitas (Ricaldi et al., 2012).

En el caso específico de las leptospiras saprófitas, presentan un tercer replicón circular llamado p74, el cual está asociado con su capacidad de supervivencia en el medio ambiente (Picardeau et al., 2008).

2.1.4 Clasificación taxonómica y nomenclatura

En la actualidad, según el subcomité de taxonomía de la Sociedad Internacional de *Leptospira* (ILS), la clasificación de *Leptospira* spp. se divide en: género *Leptospira*, la Familia Leptospiraceae, el Orden Spirochaetales, la Clase Schizomycetes y el Phylum Protofita (Arturo, 2011).

Desde 1989, *Leptospira* spp. fue dividido fenotípicamente en dos especies llamadas *Leptospira interrogans*, que abarca leptospiras patógenas, y *Leptospira biflexa*, que agrupa leptospiras de vida libre presentes principalmente en aguas superficiales (Cachay y Vinetz, 2005). Ambas especies *L. interrogans* y *L. biflexa*, se subclasifican en serogrupos y serovares, destacando sus características serológicas. Los serogrupos contiene los serovares relacionados antigénicamente, y para las cepas patógenas se conocen 24 serogrupos. La identificación de los serovares resulta crucial para entender la epidemiología de la leptospirosis, permitiendo identificar los reservorios, la virulencia de cepas y la distribución geográfica, ya que estas características cambian entre regiones y dependen del entorno que las alberga (Levett, 2001).

se escribe en mayúscula y sin cursiva, y el nombre de la cepa de referencia se coloca en mayúscula (ILS, 2021).

2.2 Leptospirosis

2.2.1 Fuente de infección

Las infecciones causadas por leptospiras persisten en una población de especies animales hospederos, que se mantienen la transmisión tanto vertical como horizontal, conformando así el reservorio de la infección. Los reservorios animales especialmente aquellos con leptospiruria prolongada, desempeñan un papel crucial, y muchos de ellos no manifiestan la enfermedad, como es el caso de las ratas, que raramente sufren lesiones visibles. Los perros, debido a su estrecha relación con el hombre, también son de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico (Rubel et al., 1997).

Cada serovar generalmente se está relacionado a huéspedes animales reservorios, que pueden ser especies insectívoros, carnívoros y rumiantes. Sin embargo, cada animal puede ser portador de uno o varios serovares de leptospiras (Acha y Szyfres, 2003).

2.2.1.1. Reservorios ambientales. La contaminación de las superficiales por las excreciones de animales infectados representa un riesgo para la transmisión de la infección a otros animales y humanos, así como para la ocurrencia de brotes de infección de origen hídrico (Terpstra et al., 2003). Entre las diferentes fuentes ambientales se encuentran:

- Aguas superficiales (agua de río, agua estancada, lagos, etc.)
- Suelos húmedos (madrigueras, corrales o bebederos)
- Agua de mar, se han encontrado leptospiras saprófitas halofílicas (resistentes a la sal).

2.2.1.2. Reservorios ambientales. Existe una amplia variedad de animales que pueden actuar como fuentes de infección para los seres humanos, siendo las siguientes especies consideradas las relevantes (Levett, 2001).

- Mamíferos pequeños: Roedores silvestres, peridomésticos (ratones, ratas, roedores de campo, etc) e insectívoros (musarañas y puercoespines).
- Animales domésticos (perros, cerdos, caballos, vacas, búfalos, etc).
- Animales criados en cautiverio (zorro plateado, visón y nutria), animales que son utilizados para la producción de piel, que representas posibles fuentes de leptospirosis para los humanos.
- Los reptiles y anfibios también pueden portar leptospirosis.

2.2.2 Transmisión

2.2.2.1. Transmisión indirecta. La leptospirosis se transmite con mayor frecuencia a individuos que desempeñan labores al aire libre, trabajan con animales, participan en actividades recreativas o tienen contacto con agua o suelo contaminados por la orina de animales infectados con leptospiras, como aguas superficiales, agua de inundación, agua de alcantarilla, ríos y arroyos. Las inundaciones o lluvias torrenciales ayudan a la transmisión de leptospirosis a cualquier persona que entre en contacto con el agua de la inundación o con tierra y agua dulce contaminadas (ríos y arroyos), aumentando el riesgo de infección (Estrada, 2013b).

2.2.2.2. Transmisión directa. La exposición a la orina infectada con leptospiras de mamíferos portadores es el principal mecanismo de transmisión. Las bacterias pueden ingresar al cuerpo humano a través de cortaduras, abrasiones en la piel o membranas mucosas intactas, como las de la nariz, boca y ojos. La transmisión involucra dos tipos de hospederos: los primarios, que eliminan la bacteria durante periodos prolongados sin mostrar síntomas, y los secundarios, que enferman gravemente y liberan la bacteria por un tiempo limitado (McDonough, 2001).

2.2.3 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación de la leptospirosis suele ser de 2-30 días, con algunos casos que pueden de 5 - 14 días en que demora en mostrarse la enfermedad. Los síntomas varían según la especie del animal, el serovar infectante, la virulencia del microorganismo y la inmunidad del huésped (Sandow y Ramírez, 2005).

La enfermedad típicamente presenta dos fases: una fase inicial (aguda o de leptospiremia), que dura de cuatro a siete días y se caracteriza por la presencia de leptospiras en la sangre, y una segunda fase inmune (inmune o leptospiruria) que dura de a 30 días, durante la cual se pueden detectar anticuerpos específicos en la circulación. Ambas fases son usuales a las dos formas clínicas de presentación: anictérica e ictericia (Céspedes, 2005).

En las formas clínicas sintomáticas, el 80-90% de los casos evolucionan hacia una forma anictérica benigna, mientras que el 10-20% se presenta como leptospirosis grave con ictericia e insuficiencia renal.

2.2.3.1. Forma anictérica. Esta fase se manifiesta de manera abrupta y dura aproximadamente una semana, presentando síntomas como fiebre (que puede ser bifásica), escalofríos, cefalea, mialgias, postración (principalmente en pantorrillas y región lumbar), dolor abdominal, náuseas o vómitos, diarrea y artralgia. Menos del 25% de los casos experimentan meningitis aséptica, y se pueden observar síntomas adicionales como dolor ocular, problemas respiratorios, hepatomegalia y esplenomegalia.

2.2.3.2. Forma icterica. La leptospirosis grave puede ser la forma más severa de la enfermedad, con síntomas que incluyen irritación conjuntival, irritación meníngea, rigidez de la nuca, insuficiencia renal, ictericia, manifestaciones hemorrágicas intestinales o pulmonares, arritmia o insuficiencia cardiaca, disnea y ocasionalmente hemorragia generalizada (Sandow y Ramírez, 2005)

2.3 Pruebas diagnósticas de laboratorio

2.3.1 Prueba de cultivo

La *Leptospira* spp. puede ser aislada de muestras biológicas animales, como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo, así como de muestras ambientales, incluyendo suelo y agua (Bharti et al., 2003). Después de recolectar la muestra, se procede a la inoculación en un medio de cultivo, siendo los más comunes el medio líquido de Ellinghause y McCullough, modificado por Johnson y Harris (EMJH), suplementado con Tween80/albumina y 5-fluorouracilo, así como otros como el medio de Korthof - Babudieri y el medio de Fletcher, entre otros. La incubación del cultivo se realiza a 28-30°C y se examina semanalmente bajo el microscopio de campo oscuro durante un periodo de 5-6 semanas antes de descartar. En caso de contaminación del cultivo, se puede proceder a la filtración antes de realizar un nuevo cultivo en un medio nuevo (Levett, 2001).

A pesar de ser un método efectivo, el cultivo presenta inconvenientes, uno de ellos, el tiempo prolongado de incubación (5-6 semanas), por lo que no se considera adecuado para definir la enfermedad (Acosta et al., 1994).

2.3.2 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las pruebas de diagnóstico molecular se han convertido en las de uso más frecuente para la detección de la leptospirosis. Estas pruebas se realizan mediante la identificación de genes característicos de especies patógenas o específicas, ofreciendo rapidez, sensibilidad y especificidad para la identificación temprana de la enfermedad. La prueba de PCR se destaca por la capacidad de amplificar de manera exponencial y específica secuencias particulares de ADN. En este proceso, se usan dos iniciadores con una especificidad del 95,2%. A lo largo del tiempo, se han desarrollado diversos protocolos de PCR, tanto de punto final como en tiempo real, destinados a la detección y cuantificación de *Leptospira* spp. en diferentes muestras, ya sean clínicas o ambientales (Martín et al., 2015).

Una limitación en el diagnóstico basado en PCR para la detección de leptospirosis radica en la incapacidad de la mayoría de los ensayos para identificar el serovar responsable de la infección. Aunque esto puede no ser crucial para el manejo individual del paciente, la identificación del serovar posee un valor epidemiológico y de salud pública significativo. Para superar esta limitación, se han diseñado estrategias que incluyen la digestión de productos de PCR a través de endonucleasas de restricción, la secuenciación directa de los amplicones y el Análisis de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) (Ahmad et al., 2005b).

2.3.3 Prueba de Microaglutinación (MAT)

Es considerada la prueba de referencia (Gold standard) a la cual se comparan todas las demás pruebas serológicas y se emplean en las verificaciones para la importación/exportación (OMSA, 2021). La Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) se puede definir como un

procedimiento en el cual se realizan varias diluciones graduales de suero que entran en contacto con una suspensión de leptospiras vivas. Esta batería de leptospiras vivas se utilizan como antígeno que comúnmente son los serovares/serogrupos más representativos de la zona (MINSA, 2012a). Esta prueba permite identificar los serogrupos/serovares responsables del proceso infeccioso y ayuda a determinar el título del suero para cada antígeno sometido, donde el título final será determinado por el grado de aglutinación de leptospiras. Por lo general, arroja resultados positivos entre los 10 a 12 días después de la aparición inicial de síntomas y signos clínicos, aunque es posible que se observe seroconversión entre el quinto y séptimo día desde el inicio de la enfermedad. Aunque presenta muy buena especificidad, su sensibilidad es relativamente menor. Se considera que los títulos a partir de 1:800 son los indicativos de sospecha de leptospirosis. Para confirmar los resultados, se necesita de una segunda muestra (no debe ser antes de dos semanas después de realizada la primera prueba), y en ese momento, el título debe aumentar cuatro veces con respecto al inicial (Terpstra et al., 2003).

2.3.4 Secuenciamiento del gen ARNr 16S

Es una técnica empleada para la identificación de cepas bacterianas, generalmente a nivel de género, e incluso, a nivel de especie en muchos casos. La amplificación del gen, seguida de la secuenciación, se realiza preferentemente a partir del ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria. El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S comprende tres fases:

- a) Amplificación del gen a partir de la muestra adecuada
- b) Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón
- c) Análisis de secuencias (Rodicio y Mendoza, 2004)

La secuenciación del ARNr 16S se presenta como un enfoque potente y simplificado para la identificación de especies de *Leptospira* spp (Morey et al., 2006)

2.4 Epidemiología

La leptospirosis, clasificada como una zoonosis, muestra características de endemia, epidemia y reemergencia, siendo más prevalente en regiones tropicales, en comparación con áreas de climas más templados como la costa. Su transmisión se observa con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo (Céspedes, 2005; OMS, 2008).

La incidencia de leptospirosis está condicionada por factores como el tipo del suelo no ácido, la humedad, las altas temperaturas, aguas contaminadas con desechos de animales, tanto salvajes como domésticos, que actúan como principales reservorios y fuentes de infección para el hombre (López, 2015b). Tiene gran impacto en la economía, ya que afecta a los animales de granja, causando pérdidas en el comercio, debido a abortos frecuentes y a la disminución de la calidad de los productos.

Los animales y humanos pueden ser clasificados como hospederos de mantenimiento, que sirven como reservorio de la *Leptospira* spp., aunque a veces no padezcan la enfermedad, u hospederos accidentales, que presentan signos y síntomas clínicos. Los hospederos accidentales, pueden desarrollar signos clínicos graves, también son los encargados de arrojar el organismo al ambiente (Acha y Szyfres, 2005). La infección humana está relacionada básicamente con riesgo laboral y recreativos, suele ocurrir por contacto directo con el reservorio animal o, con mayor frecuencia, a través de la exposición a aguas o suelos contaminados (Zunino y Pizarro, 2007).

2.5 Tratamiento

El tratamiento recomendado para la leptospirosis, según las pautas del Programa Nacional de Control de la Leptospirosis Humana, involucra el uso de diversos antibióticos, como ampicilina, azitromicina, ceftriaxona, doxiciclina y penicilina. En situaciones más

severas, podría ser necesario aplicar tratamientos complementarios, incluso en unidades de cuidados intensivos (UCI) hospitalarias (MINSA, 2012b).

Además de los mencionados, otros antibióticos que podrían considerarse incluyen amoxicilina, cloranfenicol y eritromicina.

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

Este estudio es de tipo transversal con enfoque cualitativo.

3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas (LRN MEZOB) del Instituto Nacional de Salud (INS) ubicado en la Av. Defensores del Morro N° 2268 de la sede en Chorrillos, Lima – Perú, durante los años 2022 y 2023.

3.3 Variables

- Variable independiente: la prueba del MAT, PCR y secuenciación del gen 16S ARNr de *Leptospira* spp.
- Variable dependiente: Serovares, especies del género *Leptospira* spp halladas en muestras de aguas superficiales.

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

La población de este estudio estuvo conformada por aislamiento de *Leptospira* spp., que fueron colectados de diferentes fuentes de aguas superficiales (aguas de quebradas, río, riachuelo, agua de salida de casa, cultivo de arroz, acequia, lago, agua estancada, pozo, agua de desagüe) procedentes de los departamentos de Madre de Dios, Loreto, San Martín, Ucayali, Cajamarca, Piura y La Libertad durante los años 2019 y 2022.

3.4.2 Muestra

Las muestras fueron seleccionadas por conveniencia, los aislamientos de *Leptospira* spp. provenientes de diversos tipos de muestras donde las quebradas son fuentes que el pueblo utiliza para su alimentación, los riachuelos son fuentes de depósito de corriente, el agua de

pozo es una fuente que proviene del subsuelo, es de un pozo para consumo, tal vez el pozo en si no esté contaminado, pero si la superficie, el agua estancada es una fuente producto de lluvias o del desborde del rio, y por último el agua de desagüe es una fuente utilizada para la crianza de cerdo que proviene de un fundo, estas aguas lograron ser reactivadas y purificados en medio EMJH líquido con antibiótico 8-azaguanina, a partir de medio EMJH semisólido, descritos en la tabla 1.

Tabla 1

Muestras de aguas superficiales provenientes de diferentes fuentes y zonas endémicas comprendidas en los años 2019 y 2022.

AÑO	DEPARTAMENTO	FUENTE DE LA MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRAS
2022	Cajamarca	Quebrada	10
	Piura	Quebrada	7
		Cultivo de arroz	1
	Loreto	Desagüe	2
		Río	1
	La Libertad	Riachuelo	1
2019	Ucayali	Acequia	1
	Loreto	Río (depósito)	2
		Riachuelo	1
		Pozo	2
	Madre de Dios	Agua estancada	1
		Río Tambopata	1
San Martín	Quebrada	1	
TOTAL DE MUESTRAS			32

3.5 Instrumentos

3.5.1 Equipos de laboratorio

- Cabina de Bioseguridad II-2
- Cabina para PCR
- Termociclador (Biometra Tone)

- Cámara de electroforesis horizontal
- Transiluminador UV o Generador de imágenes Bio Rad VersaDoc 4000 MP
- Vórtex
- Secuenciador 3500xL Genetic Analyzer RUO
- Baño maría
- Microcentrífuga
- Micropipetas ajustables (P-10, P-20, P-200 y P-1000)
- Microscopio óptico
- Estufa
- Concentrador
- Thermo – Shaker
- Balanza
- Congeladora -20°C
- Refrigeradora

3.5.2 *Materiales de Laboratorio*

- Puntas con filtro de micropipetas de 10 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- Tubos de cultivo con tapa rosca
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tubos de PCR de 0.2 ml
- Tubos Falcon de 50 ml y 15ml
- Soporte para tubos de PCR de 0.2 ml
- Soporte de tubos de microcentrífuga 1.5 ml
- Gradilla para tubos de microcentrífuga 1.5 ml
- Jeringas de 1 ml
- Filtro de 0.22 y 0.45 μ m

- Contenedor para material contaminado
- Criobox
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Placa óptica de Secuenciamiento
- Guantes de nitrilo
- Alcohol

3.5.3 *Materiales biológicos*

- Aislamientos de *Leptospira* spp. obtenidos de muestras de aguas superficiales.

3.5.4 *Reactivos*

- Cultivo EMJH
- Kit de extracción de DNA (Analytikjena)
- Kit de Secuenciamiento Big Dye (Applied Biosystems)
- Kit de purificación de productos de Secuenciamiento (Invitrogen)
- Componentes del PCR, constituido por:
 - Enzima Taq polimerasa
 - Buffer de Reacción (proveído con la enzima)
 - Dinucleótido trifosfato (dNTPs)
 - Cloruro de magnesio (MgCl₂)
 - Primers LepA/LepB
- Agarosa 1.5%
- Buffer de cargado para muestras de PCR
- Bromuro de Etidio

- Marcador de peso molecular Ladder DNA (Gene DireX) 100pb
- Loading Dye 1x
- Agua Ultra Pura p/PCR

3.6 Procedimientos

3.6.1 Reactivación de aislamientos de *Leptospira* spp.

Los aislamientos positivos de *Leptospira* spp. almacenados en el cepario del Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas del Instituto Nacional de Salud, fueron reactivados en medio EMJH semisólido a partir de una alícuota de 1ml en medio EMJH líquido. Los cultivos se guardaron por triplicado para su análisis posterior.

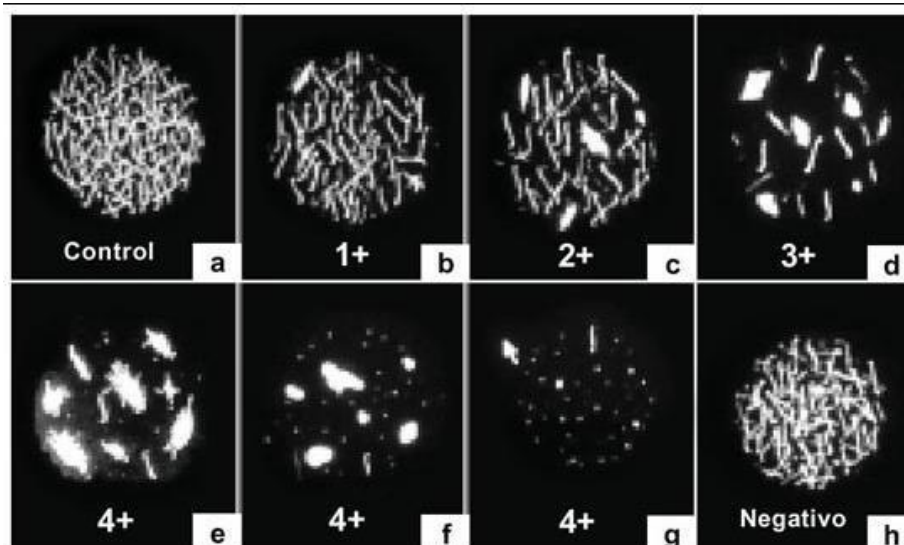
En el medio EMJH líquido se observó una forma de anillo, indicando crecimiento de la bacteria, esto se confirmó a través de la observación en un microscopio de campo oscuro a 40X de aumento.

3.6.2 Prueba de Microaglutinación para tipificación de serovares de *Leptospira* spp.

Esta prueba se realizó a partir de cultivos puros de *Leptospira* spp., libre de contaminación. En la prueba de Microaglutinación (MAT) para la tipificación se incluyeron 35 antiseros referenciales de serogrupos/serovares de *Leptospira* spp. observados en la figura 6, considerados como anticuerpos. Se siguieron las instrucciones del MET-CNSP-021 Prueba de Tipificación mediante la prueba de Microaglutinación (Anexo B). El serogrupo será asignado cuando se presente un título de aglutinación ≥ 800 , se examina en microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación y luego se determina el título de la muestra como se muestra en la figura 5

Figura 5.

Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT)



a: lamina control, b: lamina con 25% de aglutinación (zonas como copos de algodón), c: lamina con 50% de aglutinación, d: lamina con 75% de aglutinación, e: lamina con 100% de aglutinación, f: lamina con 100% de aglutinación y lisis, g: lamina con 100% de lisis, h: lamina negativa.

Figura 6.

Serovares de referencia usados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT)

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
2	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
3	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
4	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
5	<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 125
6	<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Ballum	S 102
7	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
8	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
9	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
10	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Ruebush
11	<i>L. kischneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
12	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
13	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
14	<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis	Borincana	HS 622
15	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
16	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Mankarso	Mankarso
18	<i>L. borgepetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
19	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
20	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
21	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
22	<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Alek	HS 616
23	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
24	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
25	<i>L. borgepetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin

3.6.3 Extracción de ADN

A partir de 1 ml de cultivo puro de *Leptospira* spp. libre de contaminación, se realizó la extracción de ADN siguiendo el procedimiento del manual del Kit de extracción innuPREP DNA Mini Kit (Analytikjena) (Anexo A).

3.6.4 Amplificación mediante la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La región del gen ARNr 16S de 331 pb del *rrs*, fue amplificada usando los iniciadores LepA/LepB (A Forward-5`GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3` y B reverse TTCCCCCATTGAGCAAGATT), diseñados por (Mérien et al., 1992). Se usó como control positivo el serovar *Icterohaemorrhagiae* y el control negativo fue agua de PCR.

Se preparó la mezcla de reacción, considerando la cantidad de muestra, el control positivo, negativo y el control sin plantilla (“no template control” o NTC) en el área limpia del Laboratorio de Innovación y Desarrollo (INDE), en el orden y de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla 2.

Tabla 2

Mezcla de reacción de PCR

Componentes	Con. Final	Vol (µL) (1x)
Buffer de PCR (10x)	1X	2.5
dNTPs (10mM)	200µm	1.8
Primer LepA (2µM)	0.2µM	2.5
Primer LepB (2µM)	0.2µM	2.5
MgCl₂ (50Mm)	1.5 mM	0.75
H₂O	-----	9.85
Enzima (5U/µl)	0.02U/UI	0.1
ADN	-----	5
Total		25 µl

Se añadió 5µl de muestra del DNA extraído al tubo con el mix respectivo. No se le aplicó vórtex porque fragmenta el DNA, esto afecta la eficiencia de amplificación.

Las condiciones de amplificación fueron según los parámetros de la tabla 3.

Tabla 3*Parámetros de Amplificación*

Temperatura (°C) / Tiempo	Ciclos	Pasos
95° x 10 min	1	Denaturación inicial
95° x 1 min		Denaturación
59° x 1 min	35	Hibridación
72° x 1 min		Extensión
72° x 10 min	1	Extensión final

3.6.5 Electroforesis de gel de agarosa

La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis horizontal, se utilizó el gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE (Tris-Acetate, EDTA) a una concentración 1x en un campo eléctrico de 120 voltios durante 90 minutos. También, se usó un marcador de peso molecular (GeneRuler 100pb DNA Ladder) y, por último, el gel es coloreado con bromuro de etidio al 1,5% de 1 a 2 minutos para visualizar las bandas de PCR en un fotodocumentador de imágenes.

3.6.6 Purificación

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit PureLink PCR Purification (Invitrogen) siguiendo el procedimiento del Manual de purificación de productos de PCR (Anexo C).

3.6.7 Cuantificación de los productos purificado

Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 8000, se evaluó 1ul de ADN, donde la ratio de absorbancia de 260/280 nm y que una cálida menor a 1.8 se considera buena.

3.6.8 *Electroforesis del producto de amplificación purificado*

Los productos de amplificación que fueron purificados, se observan en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio al 1.5%.

3.6.9 *Reacción de secuenciación*

Se preparó una mezcla de reacción en el área limpia del Laboratorio de Innovación y Desarrollo (INDE) con el kit Big Dye v3.0 de Applied Biosystems, en el orden y de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla 4.

Tabla 4

Mezcla de Reacción de Secuenciación

PRIMERS (FLepA, FLepB, RLepA y RLepB)		
Stock	Concentración Final	Volumen de reacción 1X
Mix Big Dye 2.5X	0.5 X	1.0
Primers (F y R) 2.5uM	0.2 μ M	1.0
Buffer Sequencing 5x	0.5 X	2.0
H₂O de PCR	-----	0
ADN (5ng/μL)	30 ng/ μ L	6.0
Volumen Total		10 μ l

Se le añadió 6 μ l de muestra del DNA de concentración 5ng/ μ l aproximadamente al mix de secuenciación. Las condiciones de amplificación que se usaron fueron según los parámetros de la tabla 5.

Tabla 5*Parámetros de Ciclaje de secuenciación*

TEMPERATURA (°C) / TIEMPO	CICLOS	PASOS
95° x 1 min	1	Denaturación inicial
95° x 10 seg	35	Denaturación
50° x 45 seg		Hibridación
60° x 4 min		Extensión

3.6.10 Purificación por columnas

La purificación de los productos de reacción de la secuenciación, se realizó mediante el uso del kit CENTRI-SEP COLUMNS, (Invitrogen) siguiendo el procedimiento del manual (Anexo D).

3.7 Análisis de datos

Para el ensamblaje y análisis de las secuencias, tanto de forward y reverse, se usó el programa Geneious Prime versión 23. Se obtuvo la secuencia consenso en formato FASTA y se realizó usando BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) un alineamiento múltiple con el algoritmo Clustal X. El análisis filogenético se realizó mediante el método de Máxima parsimonia, ayudando a minimizar el total de cambios evolutivos y se adapta mejor para secuencias cortas y con pocos sitios variables, con el programa bioinformático MEGA versión 11.

IV. RESULTADOS

Las muestras de aguas superficiales fueron recolectadas del estudio “Vigilancia de *Leptospira* en regiones endémicas de Perú” realizado en el año 2019 y 2022. Se utilizó la prueba de PCR en tiempo real para seleccionar muestras positivas, obteniendo 32 muestras de aguas superficiales en los años 2019 y 2022 las cuales se muestran en la siguiente tabla 6. Estas muestras de agua fueron cultivadas en medio EMJH semisólido, por triplicado, para su conservación.

Tabla 6

Códigos usados para cada una de las muestras

Nº	AÑO	DEPARTAMENTO	CODIGO LAB.	CODIGO INS		
1	2019	Ucayali	394	INS120274119		
2			395	INS120320419		
3		Loreto	396	INS120321419		
4			397	INS120320119		
5			398	INS120320519		
6			399	INS120693119		
7		Madre de Dios	400	INS120692719		
8			401	INS110825519		
9			402	INS110825719		
10			San Martín	403	INS114421619	
11	2022	Jaen	239	INS031163422		
12			240	INS031163522		
13			241	INS031160322		
14			242	INS031163822		
15			243	INS031163922		
16			244	INS031164022		
17			245	INS031164122		
18			246	INS031164222		
19			247	INS031164322		
20			248	INS031164422		
21				Piura	1a	INS040284522
22					2b	INS040284622
23			3a	INS040284722		
24			4a	INS040284822		
25			5a	INS040284922		
26			7b	INS040285122		
27			9a	INS040285322		
28			10a	INS040285422		
29		Loreto	362	INS080118422		
30			363	INS100177222		
31			364	INS101200822		
32		Trujillo	365	INS120482622		

4.1 Cultivo de aislamientos de leptospiras

A partir de los aislamientos de leptospiras se hicieron subcultivos de un medio EMJH semisólido a un medio EMJH líquido, para realizar los respectivos procedimientos para el estudio. Se hicieron pasajes semanales, durante 3 semanas, en medio EMJH líquido. Se revisaron los 32 aislamientos a través de microscopía directa de campo oscuro (objetivo 40X), se encontraron espiroquetas en todos los cultivos, como se muestra en la figura 7.

Figura 7.

Espiroquetas observadas mediante microscopía directa por campo oscuro (objetivo 40X)



4.2 Tipificación de serovares/serogrupos de *Leptospira* spp.

Para esta prueba sólo se procesaron 22/32 (69%) aislamientos, pues los aislamientos restantes se contaminaron durante el proceso. Se utilizaron 35 antisueros referenciales de *Leptospira* spp. para la detección de los aislamientos de leptospiras. Se encontró un aislamiento perteneciente al departamento de Piura en el 2022, se encontraron siete aislamientos reactivos a varios serovares/serogrupos, teniendo en común, Pyrogenes/Pyrogenes (1:6400) y Pyrogenes/Alexi (\geq 1:800). También se encontró un aislamiento perteneciente al departamento de Loreto del 2022, fue reactivo con diferentes títulos de anticuerpos a ocho serovares/serogrupos: Andamana/Andamana (1:6400), Celledoni/Celledoni (1:800), Javanica/Javanica (1:200), Mini/Giorgia (1:200), Pyrogenes/Pyrogenes (1:400), Sejroe/Hardjo

(1:800), Shermani/Shermani (1:800) y Hardjo/Coxi (1:200). Y en el departamento de Cajamarca del 2022, reactivo a un serovar/serogrupo, Varillal/Var-010 (1:3200). Ante esta prueba, reaccionaron un total de 9/22 (41%) aislamientos frente a 18/35 antisueros de referencia en diferentes concentraciones (Anexo E), como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7.

Aislamientos de Leptospira spp. procedentes de muestras de agua de zonas endémicas que reaccionaron frente a antisueros referenciales serogrupos/serovares.

Serogrupo/Serovar	PIURA							LORETO	JAEN	TOTAL
	1A	2B	4A	5A	7B	9A	10A	362	244	
Andamana / Andamana								*		1
Australis / Australis	*				*	*	*			4
Autumnalis / Autumnalis	*									1
Canicola / Canicola	*									1
Celledoni / Celledoni								*		1
Icterohaemorrhagiae / Icterohaemorrhagiae	*	*			*	*	*			5
Javanica / Javanica								*		1
Mini / Georgia								*		1
Pyrogenes / Pyrogenes	*	*	*	*	*	*	*	*		8
Sejroe / Wolffi	*									1
Pyrogenes / Alexi	*	*	*	*	*	*	*			7
Icterohaemorrhagiae / Copenhageni	*									1
Sejroe / Hardjo								*		1
Varillal / Var-010									*	1
Panama / Panama	*		*							2
Shermani / Shermani								*		1
Icterohaemorrhagiae / Lai	*	*		*	*	*	*			6
Hardjo / Coxi								*		1
TOTAL	10	4	3	3	5	5	5	8	1	

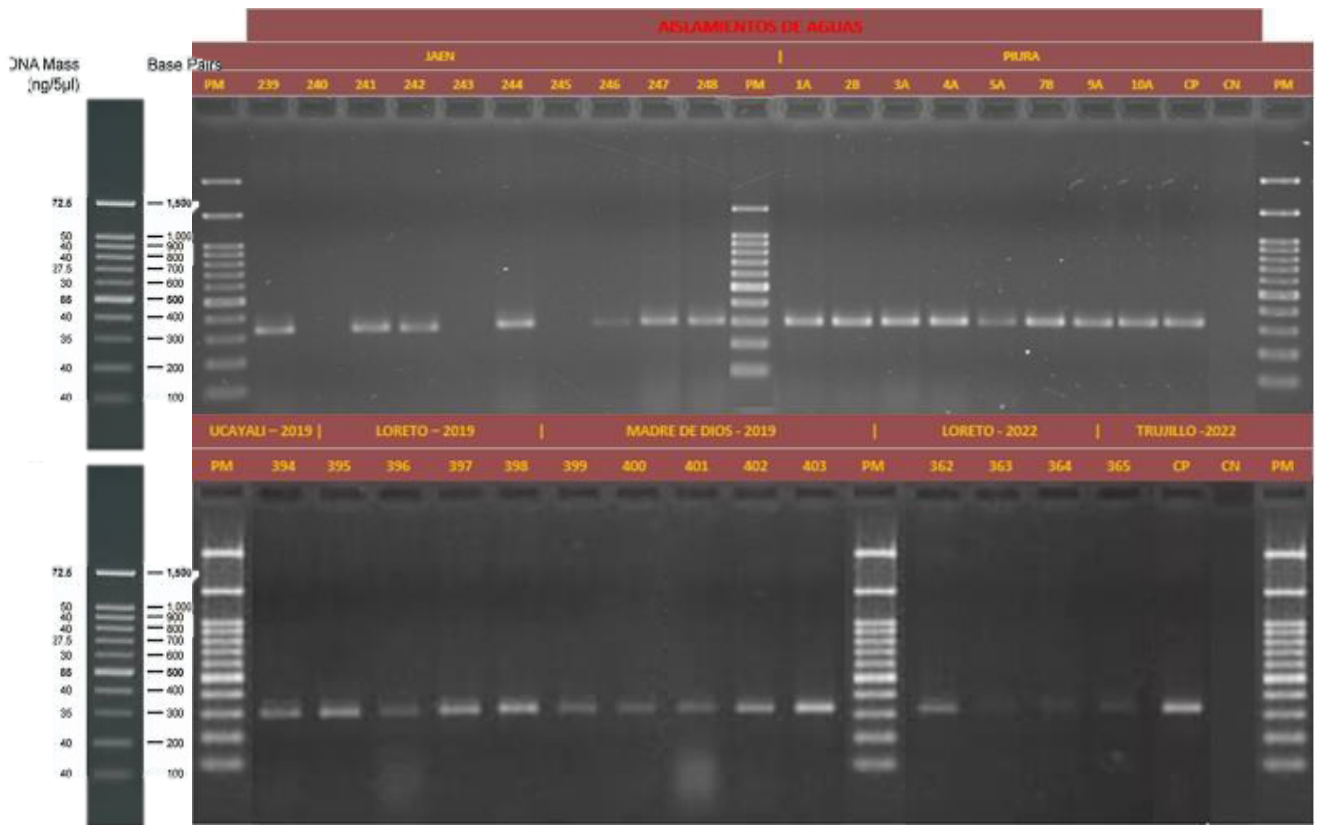
(*) Muestras de aislamientos de *Leptospira spp.* que reaccionaron a los antisueros referenciales

4.3 Evaluación de cepas por PCR

De un total de 32 muestras de aislamientos de *Leptospira spp.* analizadas por PCR, fueron positivos un 29/32 (91%) para *Leptospira spp.* Las muestras PCR positivas amplificaron regiones específicas, obteniendo una banda de amplificación de 331 pb, según Figura 8.

Figura 8.

Electroforesis del PCR convencional de los 32 aislamientos de Leptospira spp. a partir de la vigilancia de zonas endémicas de los años 2019 y 2022.



PM: Peso molecular, CP: Control positivo. CN: Control negativo. Códigos de las muestras especificados en la tabla 6.

4.4 Secuenciamiento por Sanger

Se identificó *Leptospira* spp. en aguas superficiales que circulan en diferentes ciudades del país con leptospirosis. En el análisis filogenético durante el año 2019, se encontró 3 especies del clado Saprófitos, *Leptospira jelokensis*, *L. meyeri* y *L. biflexa*; y 3 especies del clado Intermedias, *Leptospira venezuelensis*, *L. selangorensis* y *L. wolffii*. En el 2022, se obtuvieron resultados similares, con la diferencia que se obtuvo un clado caracterizado por causar la enfermedad en humanos y animales, el clado Patógenas, se hizo presente con *Leptospira interrogans* en 8/8 (100%) muestras de aguas superficiales en el departamento de Piura, causando una mayor probabilidad de contagio entre sus pobladores y animales. Además, se

encontró en la provincia de Jaén 5/7 (71%) muestras de aguas superficiales, muestras ambientales no patógenas pertenecientes al clado Saprófitos con las especies *Leptospira jelokensis* y *L. biflexa*; mientras que en del clado Intermedio se encontró a *Leptospira venezuelensis* en 2/7 (29%) aislamientos de agua superficial; en la provincia de Loreto fueron identificadas dos especies, *Leptospira wolffii* del clado Intermedias y *Leptospira biflexa* del clado Saprófitos.

El análisis de la PCR del gen 16S ARNr de 29 aislamientos ayudaron a determinar el porcentaje de identidad con especies cercanas según un análisis de BLASTn. En la Tabla 8 y Tabla 9 se muestran dichos resultados.

Tabla 8.

Resultados del análisis BLASTn de las secuencias del gen 16S ARNr amplificadas a partir de cada aislado ambiental del 2019.

2019			
AISLAMIENTO		16S ARNr	
DEPARTAMENTO	CÓDIGO DE LABORATORIO	PROBABLE ESPECIE	IDENTIDAD (%)
UCAYALI 2019	394	<i>Leptospira jelokensis</i>	98.59%
	395	<i>Leptospira jelokensis</i>	98.26%
LORETO 2019	396	<i>Leptospira venezuelensis</i>	96.72%
	397	<i>Leptospira meyeri</i>	99.29%
	398	<i>Leptospira meyeri</i>	98.94%
	399	<i>Leptospira biflexa</i>	91.88%
MADRE DE DIOS 2019	400	<i>Leptospira selangorensis</i>	97.09%
	401	<i>Leptospira wolffii</i>	97.82%
	402	<i>Leptospira wolffii</i>	96.45%
SAN MARTIN 2019	403	<i>Leptospira wolffii</i>	97.85%

Tabla 9.

Resultados del análisis BLASTn de las secuencias del gen 16S ARNr amplificadas a partir de cada aislado ambiental del 2022.

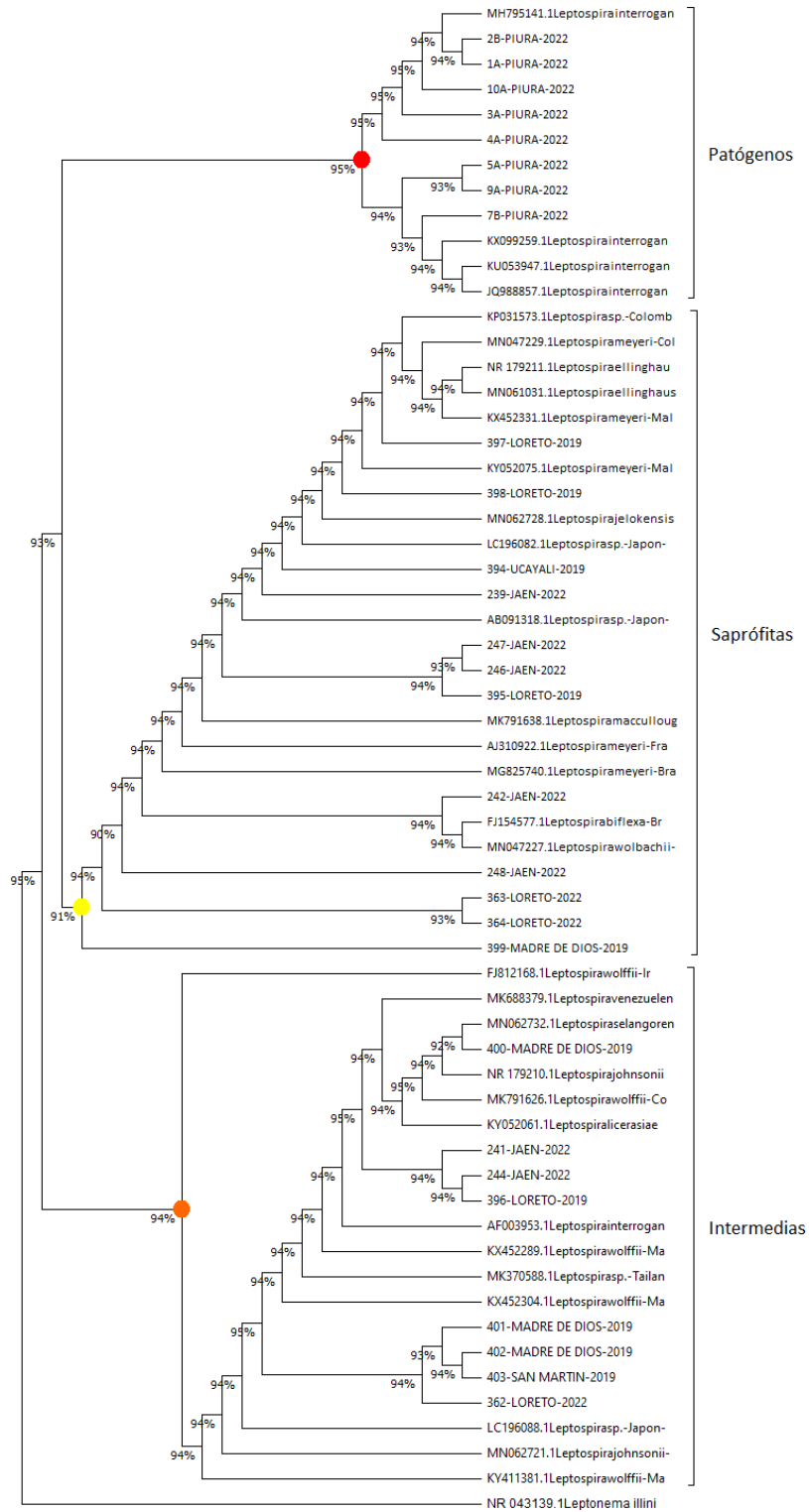
2022			
AISLAMIENTO		16S ARNr	
DEPARTAMENTO	CÓDIGO DE LABORATORIO	ESPECIE	IDENTIDAD (%)
JAEN 2022	239	<i>Leptospira jelokensis</i>	99.28%
	241	<i>Leptospira venezuelensis</i>	98.25%
	242	<i>Leptospira biflexa</i>	97.89%
	244	<i>Leptospira venezuelensis</i>	98.59%
	246	<i>Leptospira jelokensis</i>	98.55%
	247	<i>Leptospira jelokensis</i>	97.89%
	248	<i>Leptospira biflexa</i>	88.49%
PIURA 2022	1A	<i>Leptospira interrogans</i>	99.63%
	2B	<i>Leptospira interrogans</i>	99.63%
	3A	<i>Leptospira interrogans</i>	98.51%
	4A	<i>Leptospira interrogans</i>	98.88%
	5A	<i>Leptospira interrogans</i>	98.50%
	7B	<i>Leptospira interrogans</i>	97.64%
	9A	<i>Leptospira interrogans</i>	91.88%
	10A	<i>Leptospira interrogans</i>	98.14%
LORETO 2022	362	<i>Leptospira wolffi</i>	97.89%
	363	<i>Leptospira biflexa</i>	94.30%
	364	<i>Leptospira biflexa</i>	97.67%

4.5 Análisis filogenético

El análisis del árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de los 28 aislamientos de agua superficiales, mostraron que se clasifican en 3 clados principales de *Leptospira* spp.: 8/28 (29%) aislamientos fueron identificados como Patógenos, 12/28 (42%) aislamientos Intermedios y 8/28 (29%) aislamientos Saprófitos. Se incluyó *Leptonema illini* como grupo externo para el árbol filogenético. Las ramas filogenómicas están agrupadas por patógenos de color rojo, saprofitas de color amarillo e intermedias de color naranja.

Figura 9.

Árbol filogenético de Máxima parsimonia de secuencias parciales de 16S ARNr de Leptospira spp. aisladas de muestras de aguas superficiales.



V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, se quiere informar sobre el aislamiento y tipificación de 32 cepas de *Leptospira* spp provenientes de aguas superficiales de diferentes departamentos del Perú, los cuales vienen causando infección a pobladores aledaños a estos cuerpos de agua, sobre en el departamento de Piura, según nuestro estudio, donde encontramos aislamientos Patógenos. En los últimos 15 años en el Perú, los reportes sobre la frecuencia de leptospirosis humana en base a las pruebas de ELISA IgM y MAT, mostraron que 36.6% de casos febriles y 64.6% en la población en general (Alarcón-Villaverde et al., 2014). En un estudio, la leptospirosis se evidenció en 38 pacientes (26.6%), donde se concluyó que representaba a una alta frecuencia de la enfermedad y una amplia distribución de la leptospirosis en varias regiones del norte (Silva-Díaz et al., 2015).

En este estudio, se describe los serovares/serogrupos hallados en 9 de las muestras, donde los más comunes fueron: Pyrogenes/Pyrogenes 88.9% (8/9), Pyrogenes/Alexi 77.8% (7/9), Icterohaemorrhagiae/Lai 66.7% (6/9), Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae 55.6% (5/9) y Australis/Australis 44.4% (4/9). Un estudio realizado en la región San Martín, se encontraron serovares en común, como Icterohaemorrhagiae (34.6%) y Australis (12.7%), adicionalmente a esos serovares también se encontraron más frecuentes a Bataviae, Bratislava, Georgia y Djasiman (Cruz et al., 2002). En otras regiones endémicas del Perú, la prevalencia de los serovares varían, en el caso de un estudio en Madre de Dios (Céspedes et al., 2003) y Ucayali (Céspedes et al., 2004), los serovares más frecuentes fueron Georgia y Bratislava, mientras que en Ayacucho los serovares más frecuentes fueron Icterohaemorrhagiae, Djasiman, Varillal y Panama (Vargas-Cuba et al., 2008).

El enfoque de este estudio fue identificar *Leptospira* spp a nivel molecular lo cual no iba a ser posible mediante el diagnóstico de microscopia de campo oscuro, sin embargo, fue necesario para una identificación inicial, donde se pudo reconocer morfológicamente a las leptospiras en las cepas. A diferencia de otros estudios que intentaron identificar mediante microscopia muestras de orina y sangre, donde no se pudo observar ningún tipo de *Leptospira* spp (Arturo, 2011). La visualización directa bajo microscopía de campo oscuro, se considera como una metodología base para el diagnóstico de la detección de leptospirosis en fluidos y muestras ambientales, pero en muchos casos se puede diagnosticar falsos positivos, porque la leptospira puede confundirse con otro tipo de espiroquetas (Ellis et al., 1981). Este diagnóstico de falsos positivos y falsos negativos que se genera a través de esta prueba, obligan a que estos resultados se confirmen con otras pruebas (Hunter, 2001).

Los resultados de PCR del presente estudio fueron sensibles y específicos para la detección de leptospirosis en muestras de aguas superficiales. Con la PCR hemos logrado detectar ADN de leptospiras patógenas e intermedias y diferenciarlas de las no patógenas, pero no se puede diferenciar serovares.

La *Leptospira* spp posee un desarrollo lento en el medio EMJH, ya que esta especie es muy exigente para su supervivencia, este medio es el más apropiado y utilizado mundialmente para el crecimiento de cepas de leptospiras saprofitas, intermedias y patógenas (Arencibia et al., 2021). En este estudio se utilizó el medio EMJH semisólido y líquido para realizar pasajes y poder mantener en un ambiente adecuado y temperatura correcta, y puedan crecer de una manera correcta, esto ayudará a tener una mejor concentración de *Leptospira* spp para una mejor extracción de ADN.

Para este estudio los aislamientos de agua superficial en la prueba de tipificación de MAT, presentaron títulos desde 1:100 hasta 1:6400, estos títulos son de importancia, ya que,

al presentar una mínima cantidad, hace referencia a que la bacteria ya está presente en esta muestra ambiental. En la actualidad la prueba estándar para la detección de anticuerpos contra leptospiras es el Test de Aglutinación Microscópica (MAT), el cual expone 24 diluciones seriadas de suero sanguíneo de un paciente a diferentes cepas de leptospiras; la presencia de anticuerpos en el suero conduce a la aglutinación de las leptospiras (reacción serológica). De esta manera los títulos que se obtiene del MAT corresponden a la mayor dilución del suero del paciente en el que al menos 50% de las leptospiras aglutinan, o de una titulación de 1:800, sin embargo, portadores asintomáticos pueden ser negativos en las técnicas serológicas ya que los títulos caen rápidamente y las leptospiras albergadas en el riñón no ejercen estímulo antigénico (Murray, et al., 2011).

VI. CONCLUSIONES

- Este estudio identificó diferentes especies de *Leptospira* en aguas superficiales, principalmente en ríos y quebradas, que son las principales fuentes de uso laboral y doméstico. Los únicos que presentaron *Leptospira* spp. del clado Patógena, fueron encontradas alrededor del Centro Poblado de Pueblo Nuevo y Linderos de Maray, Morropón, Piura, estos resultados deberán tomarse en consideración como fuentes potenciales de infección por leptospirosis.
- Los diversos brotes que se presentaron en los años 2019 y 2022, pusieron en alerta al sector salud, por presentar alto porcentaje de manifestaciones clínicas, es por ello la importancia de instaurar métodos de diagnósticos en las diferentes zonas donde ocurran estos casos, para que haya una mayor rapidez para el tratamiento del paciente.
- En los países desarrollados, la leptospirosis sigue siendo una enfermedad de considerable importancia económica en la cría de animales, pero la mayor carga de enfermedad humana sigue estando en los países en desarrollo tropicales y subtropicales. Varios brotes recientes de leptospirosis han llamado la atención sobre los posibles efectos del cambio climático y la actividad humana en la incidencia de la enfermedad y el amplio espectro de manifestaciones clínicas.
- Los resultados obtenidos corroboran la necesidad de implementar el diagnóstico de *Leptospira* spp mediante la PCR y el secuenciamiento, con el fin de proporcionar mayor información para obtener diagnóstico y medidas de prevención en beneficio de los humanos y animales, evitando así que la enfermedad trascienda.

VII. RECOMENDACIONES

- Debido a la limitación que se tuvo con respecto a las muestras que fueron contaminadas, se recomienda mejor en la calidad de almacenamiento, verificar y almacenar con mayor prevención ya que algunas muestras se contaminaron por el ambiente en que fueron tratadas, tal vez se deba al mal cerrado del recipiente o a la manipulación que tuvo para su uso.
- Para un mejor diagnóstico y reconocimiento de especies de *Leptospira*, se recomienda el secuenciamiento y la detección mediante PCR, para muestras de aguas y sangre de pobladores que vivan alrededor, también sería ideal implementar la PCR en tiempo real, la cual brinda resultados más sensibles y específicos.
- A pesar de la evidencia encontrada en este estudio, se requiere mayor investigación en otras regiones del país, donde se encuentre condiciones favorables para la presencia de la enfermedad, en el cual se pueda obtener un panorama completo de la situación epidemiológica del evento en todo el territorio nacional y se pueda levantar la carga de la enfermedad.

VIII. REFERENCIAS

- Abdullah, M., Kadivella, M., Sharma, R., Baig, M. S., Faisal, S. M., y Azam, S. (2021). *Comparative analysis of whole genome sequences of Leptospira spp. From RefSeq database provide interspecific divergence and repertoire of virulence factors* (p. 2021.01.12.426470). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426470>
- Acha, P. N., y Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 1: Bacterioses and mycoses* (3. ed., 2. pr.-2003). Pan American Health Organization.
- Acha, P. N., y Szyfres, B. (2005). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre. *Revista Española de Salud Pública*, 79(3), 423-423.
- Acosta, H., Moreno, C. H., y B, D. V. (1994). Leptospirosis. Revisión de tema. *Colombia Médica*, 25(1), Article 1.
- Adler, B., y de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Ahmad, S. N., Shah, S., y Ahmad, F. H. (2005a). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3), Article 3.
- Ahmad, S. N., Shah, S., y Ahmad, F. H. (2005b). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3), 195.
- Alarcón-Villaverde, J. O., Romani-Romani, F., Tejada, R. A., Wong-Chero, P., y Céspedes-Zambrano, M. (2014). Seroprevalencia de leptospirosis y características asociadas en agricultores de arroz de una región tropical del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.312.35>
- Alonso-Andicoberry, C., Garcia Peña, F., y Moroa, L. M. (2022). Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. *Investigación agraria. Producción y sanidad animales*, ISSN 0213-5035, Vol. 16, Nº 2, 2001, pags. 205-226.

Arencibia, D., Batista, N., Fernández, K., Rosario, L., Parra, Blain, K., y García, L. (2021).

Impacto de los cambios realizados en la etapa de multiplicación celular durante la obtención de la Sustancia Sensibilizante de Eritrocitos utilizada en el diagnóstico serológico de la Leptospirosis. | Ars Pharmaceutica (Internet).

<https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4760>

Arturo, E. S. (2011). *DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA EN ORINA DE PACIENTES CRÓNICOS Y PERROS MEDIANTE PCR EN EL VALLE DEL CAUCA.* 81.

Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M., y Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious Diseases*, 3(12), 757-771.

[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)

Cachay, E., y Vinetz, J. (2005). A Global Research Agenda for Leptospirosis. *Journal of postgraduate medicine*, 51(3), 174-178.

Carrada-Bravo, T. (2005). Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 52(4), Article 4.

Céspedes, M. (2005a). *Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente.*

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008

Céspedes, M. (2005b). *Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente.*

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008

Céspedes Z, M., Fernández C, R., Rimarachín D, R., Taipe S, H., Cenepo T, J., Mori y

Gonzales, M., Torres T, I., Castillo C, C., Balda J, L., Tapia L, R., Gonzalez Q, D., y

- Glenny A, M. (2004). Leptospirosis: Una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 21(2), 62-70.
- Céspedes Z, M., Ormaeche M, M., Condori, P., Balda J, L., y Glenny A, M. (2003). Prevalencia de Leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la Provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 20(4), 80-185.
- Chaiwattananrungruengpaisan, S., Suwanpakdee, S., Sangkachai, N., Chamsai, T., Taruyanon, K., y Thongdee, M. (2018). Potentially Pathogenic *Leptospira* Species Isolated from a Waterfall in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 71(1), Article 1. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.363>
- Chaiwattananrungruengpaisan, S., Thepapichaikul, W., Paungpin, W., Ketchim, K., Suwanpakdee, S., y Thongdee, M. (2020). Potentially Pathogenic *Leptospira* in the Environment of an Elephant Camp in Thailand. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5040183>
- Cruz M, R., Fernández V, F., y Arévalo R, H. (2002). Hiperendemicidad de leptospirosis y factores de riesgo asociados en localidades arroceras del departamento de San Martín—Perú¹. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 19(1), 10-16.
- Dong, H., Hu, Y., Xue, F., Sun, D., Ojcius, D. M., Mao, Y., y Yan, J. (2008). Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiology*, 8(1), 223. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-223>

- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., y Cassells, J. (1981). Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *The Veterinary Record*, 108(26), 555-557. <https://doi.org/10.1136/vr.108.26.555>
- Estrada, Y. (2013a). Estandarización de una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira saprófitas* y patógenas en muestras de animales domésticos. 56.
- Estrada, Y. (2013b). Estandarización de una multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira saprófitas* y patógenas en muestras de animales domésticos. 56.
- Faine, S. (1994). *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., y Perolat, P. (2000). «*Leptospira*» and leptospirosis. MediSci. <https://research.monash.edu/en/publications/leptospira-and-leptospirosis>
- Gamberini, M., Gómez, R. M., Atzingen, M. V., Martins, E. A. L., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C., Leite, L. C. C., Ho, P. L., y Nascimento, A. L. T. O. (2005). Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.004>
- Gillespie, S. H. (2016). Manual of Clinical Microbiology edited by James H. Jorgensen and Michael A. Pfaller. *The Quarterly Review of Biology*, 91(2), Article 2. <https://doi.org/10.1086/686849>
- Grune Loffler, S. (2022). *Manual sobre diagnóstico molecular de leptospirosis* [Info:ar-repo/semantics/libro]. INTA Ediciones. <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/12122>
- Hunter, P. (2001). OIE manual for standards of diagnostic tests and vaccines (4th edition), Office International des Epizooties: Book review. *Journal of the South African Veterinary Association*, 72. <https://doi.org/10.4102/jsava.v72i3.646>
- ILS. (2021). *Sociedad Internacional de Leptospirosis*. <https://leptosociety.org/>

- Ko, A. I., Goarant, C., y Picardeau, M. (2009). Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- Laplume, D. H., Sardi, D. F., y Samartino, D. L. (2014). *Enfermedades infecciosas | leptospirosis*. 50.
- Levett, P. N. (2001a). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P. N. (2001b). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P. N. (2001c). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Lopardo, H. A., Predari, S. C., y Vay, C. (2021). *Bacterias de Importancia Clínica*. 77.
- López, F. B. O. (2015a). Tratamiento de la leptospirosis humana. Alternativa antibiótica. *Archivos de medicina*, 11(2), Article 2.
- López, F. B. O. (2015b). Tratamiento de la leptospirosis humana. Alternativa antibiótica. *Archivos de medicina*, 11(2), 2.
- Lozano, J. C., Carrasco, I. R. Z., y Domínguez, J. V. (2010). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la leptospira en México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 23.24(92), Article 92.
- Martín, P. L., Arauz, M. S., y Stanchi, N. O. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: Ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Veterinaria*, 35(1), Article 1. <https://doi.org/10.24215/15142590ep>
- Martone, W. J., y Kaufmann, A. F. (1979). Leptospirosis in Humans in the United States, 1974—1978. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(6), Article 6. <https://www.jstor.org/stable/30110977>

- Masuzawa, T., Saito, M., Nakao, R., Nikaido, Y., Matsumoto, M., Ogawa, M., Yokoyama, M., Hidaka, Y., Tomita, J., Sakakibara, K., Suzuki, K., Yasuda, S., Sato, H., Yamaguchi, M., Yoshida, S., Koizumi, N., y Kawamura, Y. (2019). Molecular and phenotypic characterization of *Leptospira johnsonii* sp. Nov., *Leptospira ellinghausenii* sp. Nov. And *Leptospira ryugenii* sp. Nov. Isolated from soil and water in Japan. *Microbiology and Immunology*, 63(3-4), Article 3-4.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12671>
- McDonough, P. (2001, julio 19). *Leptospirosis en caninos—Estado actual* | IVIS.
<https://www.ivis.org/library/recent-advances-canine-infectious-diseases/leptospirosis-en-caninos-estado-actual>
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., y Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2219-2224.
- MINSA. (2012a). *Norma técnica de salud para la atención integral de la persona afectada con leptospirosis*. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/321647-norma-tecnica-de-salud-para-la-atencion-integral-de-la-persona-afectada-con-leptospirosis>
- MINSA. (2012b). *Norma técnica de salud para la atención integral de la persona afectada con leptospirosis*. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/321647-norma-tecnica-de-salud-para-la-atencion-integral-de-la-persona-afectada-con-leptospirosis>
- Mohammed, D. H., Cohen, N., Hakim, K., Aziz, F., y Belahsen, R. (2011). LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *J Bacteriology and Parasitology* ISSN:2155-9597, 2, 2:6. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000120>

- Mohd Ali, M. R., Mohamad Safiee, A. W., Yusof, N. Y., Fauzi, M. H., Yean Yean, C., y Ismail, N. (2018). Isolation of *Leptospira kmetyi* from residential areas of patients with leptospirosis in Kelantan, Malaysia. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.12.008>
- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., y Levett, P. N. (2006). Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(10), 3510-3516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06>
- Nascimento, A. L. T. O., Ko, A. I., Martins, E. a. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Ho, P. L., Haake, D. A., Verjovski-Almeida, S., Hartskeerl, R. A., Marques, M. V., Oliveira, M. C., Menck, C. F. M., Leite, L. C. C., Carrer, H., Coutinho, L. L., Degraeve, W. M., Dellagostin, O. A., El-Dorry, H., Ferro, E. S., Ferro, M. I. T., ... Van Sluys, M. A. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, *186*(7), 2164-2172. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004>
- OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). Acceso en línea al Manual Terrestre. *OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- OMS. (2008a). *Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud e International Leptospirosis Society. Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Serie de Manuales Técnicos, 12.* www2.paho.org/hq/dndocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-spa.pdf
- OMS. (2008b). *Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud e International Leptospirosis Society. Leptospirosis humana: Guía para el*

diagnóstico, vigilancia y control. Serie de Manuales Técnicos, 12. www2paho.

org/hq/dndocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-spa.pdf

Picardeau, M. (2015). Genomics, proteomics, and genetics of leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 43-63. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4

Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

Picardeau, M., Brenot, A., y Saint Girons, I. (2001). First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology*, 40(1), 189-199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02374.x>

Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., Creno, S., Kuczek, E. S., Bommezzadri, S., Davis, J. C., McGrath, A., Johnson, M. J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R. L., Rood, J. I., Lajus, A., Davies, J. K., ... Adler, B. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE*, 3(2), e1607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>

Pui, C. F., Bilung, L. M., Apun, K., y Su'ut, L. (2017). Diversity of *Leptospira* spp. In Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. *Journal of Tropical Medicine*, 2017, e3760674. <https://doi.org/10.1155/2017/3760674>

Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., Zhang, Y.-X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.-F., Jiang, H.-Q., Jia, J., Tu, Y.-F., Jiang, J.-X., Gu, W.-Y., Zhang, Y.-Q., Cai, Z., Sheng, H.-H., Yin, H.-F., ... Zhao, G.-P. (2003). Unique physiological and

pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing.

Nature, 422(6934), 888-893. <https://doi.org/10.1038/nature01597>

Ricaldi, J. N., Fouts, D. E., Selengut, J. D., Harkins, D. M., Patra, K. P., Moreno, A., Lehmann, J. S., Purushe, J., Sanka, R., Torres, M., Webster, N. J., Vinetz, J. M., y Matthias, M. A. (2012). Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1853. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>

Rodicio, M. del R., y Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.

Rubel, D., Seijo, A., Cernigoi, B., Viale, A., y Wisnivesky-Colli, C. (1997). *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: Variables asociadas con la seropositividad. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2(2), 102-106. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891997000800002>

Sadow, K., y Ramírez, W. (2005). *Leptospirosis (Leptospirosis)*. 62.

Scialfa, E., Grune, S., Brihuega, B., Aguirre, P., y Rivero, M. (2018). Aislamiento de *Leptospira* spp. Saprofitas desde fuentes de agua en un ambiente seleccionado de Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 50(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.003>

Silva, É. F., Cerqueira, G. M., Seyffert, N., Seixas, F. K., Hartwig, D. D., Athanazio, D. A., Pinto, L. S., Queiroz, A., Ko, A. I., Brod, C. S., y Dellagostin, O. A. (2009). *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 621-623. <https://doi.org/10.3201/eid1504.071669>

Silva, É. F., Santos, C. S., Athanazio, D. A., Seyffert, N., Seixas, F. K., Cerqueira, G. M., Fagundes, M. Q., Brod, C. S., Reis, M. G., Dellagostin, O. A., y Ko, A. I. (2008).

CHARACTERIZATION OF VIRULENCE OF *Leptospira* ISOLATES IN A HAMSTER MODEL. *Vaccine*, 26(31), 3892-3896.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.085>

Silva-Díaz, H., Llatas-Cancino, D. N., Campos-Sánchez, M. J., Aguilar-Gamboa, F. R., Mera-Villasis, K. M., y Valderrama-Ayén, M. Y. (2015). Frecuencia de leptospirosis y características socio-demográficas en pacientes febriles del norte del Perú. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 530-535. [https://doi.org/10.4067/S0716-](https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600006)

10182015000600006

Sonthayanon, P., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J., Kalambaheti, T.,

Boonsilp, S., Amornchai, P., Smythe, L. D., Limmathurotsakul, D., Day, N. P., y

Peacock, S. J. (2011). Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for

diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *The American Journal of Tropical*

Medicine and Hygiene, 84(4), Article 4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0473>

Stone, N. E., Hall, C. M., Ortiz, M., Hutton, S. M., Santana-Propper, E., Celona, K. R.,

Williamson, C. H. D., Bratsch, N., Fernandes, L. G. V., Busch, J. D., Pearson, T.,

Rivera-Garcia, S., Soltero, F., Galloway, R., Sahl, J. W., Nally, J. E., y Wagner, D. M.

(2022). Diverse lineages of pathogenic *Leptospira* species are widespread in the

environment in Puerto Rico, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(5), Article

5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009959>

Terpstra, W. J., World Health Organization, e International Leptospirosis Society (Eds.).

(2003). *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*.

World Health Organization.

Terzolo, H., y Catena, M. (2007). *Microbiología Veterinaria. Capítulo 34: Campylobacter* (2°).

Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpai boon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A. T., Suputtamongkol, Y., White, N. J., Feil, E. J., Day, N. P. J., y Peacock, S. J. (2007). A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056>

Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., y Peñafiel, N. (2002). *Adaptación de Leptospira interrogans (sensu stricto) al agua dulce*.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000100003

Turner, L. H. (1970). Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(4), 623-646. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(70\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(70)90087-8)

Vargas-Cuba, F., García-Apaico, V., Céspedes, M., Palomino-Enciso, M., y Ayala-Huaytalla, T. (2008). Seroprevalencia y factores asociados con leptospirosis en pacientes con síndrome febril en Ayacucho, Perú 2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(2), 190-194.

Vincent, A. T., Schiettekate, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Khalid, M. K. N. M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A. A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., y Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

Zaki, A. M., Hod, R., Shamsusah, N. A., Isa, Z. M., Bejo, S. K., y Agustar, H. K. (2020).

Detection of *Leptospira kmetyi* at recreational areas in Peninsular Malaysia.

Environmental Monitoring and Assessment, 192(11), Article 11.

<https://doi.org/10.1007/s10661-020-08639-x>

Zulkifli, N. F., Wan, S. J., Neela, V. K., Chee, H. Y., Masri, S. N., Jamil Al-Obaidi, M. M., y

Mohd Desa, M. N. (2018). Detection of *Leptospira* Species in Environmental Samples

by Amplification of 16s rRNA and rpo β Genes. *Sains Malaysiana*, 47(8), Article 8.

<https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4708-18>

Zunino M., E., y Pizarro P., R. (2007). *Leptospirosis: Puesta al día*.

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182007000300008

IX. ANEXOS

- **Anexo A:**

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Aislamiento de cultivos celulares

1. Sedimento hasta 5×10^6 células por centrifugación durante 10 min a 5000 x g. Desechar el sobrenadante. Agregue **400 µl de Lysis Solution TLS** y **25 µl de proteinasa K** al sedimento, mezcle vigorosamente mediante agitación vorticial pulsada durante 5 segundos. Incubar a 50°C hasta la lisis completa de la muestra.

NOTA:

Recomendamos utilizar una plataforma de agitación (mezclador térmico, baño de agua u otra plataforma basculante) para una agitación continua de la muestra. Después, agite la muestra 3 o 4 veces durante la incubación. No agitar reducirá la eficiencia de lisis.

2. Agregue **400 µl de Binding Solution TBS** a la muestra lisada, mezcle con un vórtex breve durante 15 segundos.

IMPORTANTE:

El estrés mecánico por vórtice o mezcla extensiva conduce al corte del ADN cromosómico de alto peso molecular. Pero es importante que la muestra y **Binding Solution TBS** se mezclen completamente para obtener una solución homogénea.

3. Aplique la muestra al filtro giratorio ubicado en un tubo receptor. Cierre la tapa y centrifugue a 11000 x g durante 2 minutos.

NOTA:

Si la solución no ha pasado por completo a través del filtro giratorio, centrifugue nuevamente a mayor velocidad o prolongue el tiempo de centrifugado.

4. Deseche el tubo receptor con el filtro. Coloque el filtro giratorio en un tubo receptor nuevo.

5. Abra el filtro giratorio y agregue **500 µl de Washing Solution HS**, cierre la tapa y centrifugue a 11000 x g durante 1 minuto. Deseche el tubo receptor con el filtrado. Coloque el filtro giratorio en un tubo receptor nuevo.

6. Abra el filtro giratorio y agregue **750 µl de Washing Solution MS**, cierre la tapa y centrifugue a 11000 x g durante 1 minuto. Deseche el tubo receptor con el filtrado. Coloque el filtro giratorio en un tubo receptor nuevo.

7. Centrifugar a 11000 x g durante 3 minutos para eliminar todos los restos de etanol. Deseche el tubo receptor.

8. Coloque el filtro giratorio en un tubo de elución. Abra con cuidado la tapa del Spin Filter y agregue **200 µl de Elution Buffer**. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 11000 x g durante 1 minuto. Un segundo paso de elución aumentará el rendimiento del ADN extraído.

NOTA:

El ADN se puede eluir con un volumen menor o mayor de tampón de elución (depende del rendimiento esperado de ADN genómico). La elución con volúmenes más bajos de Elution Buffer aumenta la concentración final de ADN. Conservar el ADN extraído a una temperatura de 4 °C a 8 °C. Para almacenamientos prolongados se recomienda la colocación entre -18 °C y -22 °C hasta la realización del PCR.

- **Anexo B**

PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN

Prueba de tamizaje

1. Se realiza la observación de la presencia de leptospiras en medio EMJH semi sólido, a través de microscópica en campo oscuro, se procede a la purificación de la *Leptospira* spp para los aislamientos. Se retira 1ml de cultivo con una pipeta estéril y se realiza un sub cultivo en un tubo de vidrio (20x150) con 9ml de medio líquido EMJH, para mantener la cepa libre del agar. Se incubará a 28 - 30°C durante un periodo de 7 días.
2. Se preparará diluciones de los antisueros referenciales: 1:50 (784 µl de PBS y 16 µl de antisuero) volumen final 800 µl en tubos de microdilución. Se preparará en un dilutor agregando 1ml de PBS, como control negativo del cultivo en estudio (CN). Se homogenizará las diluciones de los antisueros con micropipeta multicanal, después se rotulará las microplacas con el código de cultivo en estudio. Se distribuirá en las microplacas 8 columnas para aislamientos en estudio y 12 filas para los antisueros referenciales.
3. Se agregará 30 µl de los antisueros (debidamente diluido 1/50), a cada uno de los 12 pocillos de su respectiva columna. El cual corresponde a los 12 primeros antisueros, igual se procederá para la segunda microplaca el cual corresponderá a los 12 antisueros faltantes. Se homogeneizará cuidadosamente la mezcla de antisuero y antígeno mediante la aplicación de unos ligeros golpes en los bordes de la placa.
4. Se cubrirá la microplaca e incubar por 1 – 2 horas a 28° - 30° C. Extraer con la micropipeta multicanal 10 µl aproximadamente de la mezcla antígeno – antisuero referencial y traspasar a una lámina portaobjeto. La lectura se realizará utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X y sin cubreobjetos. Se observará el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antisuero referencial.

Prueba de titulación

1. Después de realizar el tamizaje de los aislamientos en estudio y si presentan aglutinaciones igual o mayor a 3+ con uno o más antisueros referenciales en la dilución final 1:100, se debe realizar la titulación de dicho aislamiento enfrentándola únicamente con aquellos antisueros con los que presento aglutinaciones iguales o mayores a 3+.
2. Se preparará una placa de microtitulación horizontalmente y en las filas se colocará el código del aislamiento en estudio y el código de los antisueros. Las columnas (del 2 al 11) corresponden a las diluciones dobles, que empiezan con 1:100 hasta 1:51200. Las columnas 12 corresponde al control negativo. A partir de la tercera columna se agregará 30 µl de PBS hasta la columna 12.
3. Se realizará una dilución 1:50 del antisuero a titular en los pocillos de la primera columna (98 µl de PBS + 2 µl de antisuero) en un volumen final de 100 µl. Con una micropipeta multicanal, se agregará en la 2da y 3ra columna 30 µl de antisuero diluido 1:50 de la primera columna, mezclar bien el suero diluido con el PBS en la 3ra columna, luego extraer 30 µl y verterlo en la 4ta columna y así sucesivamente continuar con todas las diluciones a lo largo de la fila, hasta la 11ava columna.
4. Se descartará los últimos 30 µl y se dejará libre la 12ava columna, esta se usará como control de antígeno. En cada fila agregar 30 µl de antígeno que corresponde al aislamiento en estudio. Se homogenizará cuidadosamente la mezcla de antisuero y antígeno mediante la aplicación de unos ligeros golpes en los bordes de la placa.
5. Se cubrirá la microplaca e incubar por 1 – 2 horas a 28° - 30° C. Extraer con la micropipeta multicanal 10 µl aproximadamente de la mezcla antígeno – antisuero referencial y traspasar a una lámina portaobjeto. La lectura se realizará utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X y sin cubreobjetos. Se observará el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antisuero referencial, según la escala de 1 a 4 cruces.

- **Anexo C:**

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN

Procedimiento para purificar productos de PCR

1. Combinar. Añadir 4 volúmenes de Binding Buffer B2 o B3 con isopropanol a 1 volumen de una muestra de PCR (50–100 µL). Mezclar bien

2. Carga. Pipetee la muestra en una columna giratoria PureLink® en un tubo de recolección. Centrifugar la columna a $>10\,000 \times g$ durante 1 minuto. Deseche el flujo continuo.

3. Lave. Vuelva a insertar la columna en el tubo de recolección y agregue 650 µL de lavado. Tampón (W1) con etanol. Centrifugar la columna a $>10\,000 \times g$ durante 1 minuto. Deseche el flujo continuo y coloque la columna en el mismo tubo de recolección. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 2-3 minutos.

4. Eluir. Coloque la columna en un tubo de elución limpio de 1,7 ml (suministrado con el kit). Agregue 50 µL de tampón de elución al centro de la columna. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 2 minutos. El tubo de elución contiene la PCR purificada. producto. Guarde el ADN purificado a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento a largo plazo.

- **Anexo D:**

PURIFICACIÓN POR COLUMNA

Hidratación de la columna

1. Golpear suavemente la columna para asegurar que el gel se siente en la parte inferior de la columna de centrifugación.
2. Retirar la tapa de la columna y reconstruir la columna mediante la adición de 800 μ l de agua de grado reactivo. Deje el tampón final de la columna en su lugar por lo que la columna pueda ponerse de pie por sí mismo. Colocar la tapa de la columna e hidratar el gel por agitación e inversión de la columna o vórtex brevemente. Es importante hidratar todo el gel seco.
3. Dejar por lo menos 30 minutos de hidratación a temperatura ambiente antes de usar las columnas. Las columnas reconstruidas pueden conservarse en refrigeración a 4°C durante varios días. El almacenamiento se puede realizar en 10mM de ácido de sodio (NaN₃). Para continuar con los procedimientos dejar que las columnas refrigeradas se temperen a temperatura ambiente.

Extracción del líquido intersticial

1. Eliminar las burbujas de aire del gel de la columna mediante la inversión de la columna.
2. Después de que el gel se ha asentado y esté libre de burbujas, primero quite la tapa de la columna superior y a continuación retire el tapón que está en el extremo inferior.
3. Haga girar la columna y el tubo centrifugar a una velocidad a 750 x g durante 2 minutos para extraer el líquido. Si utiliza una microcentrífuga, es importante no perder de vista la posición de la columna usando la marca de orientación moldeado en la columna.
4. Desechar el tubo de lavado y el líquido. No permita que el material de gel se seque en exceso. Proceso de la muestra dentro de los próximos minutos.

Procesamiento de la muestra

1. Transferir 20 μ l de DyeDeoxy completado mezcla de reacción a la terminación de la parte superior del gel. Cuidadosamente dispensar la muestra directamente sobre el centro de la cama gel en la parte superior de la columna, sin alterar la superficie del gel. No tocar con la punta de la pipeta, ya que esto puede reducir la eficacia de la depuración y, posiblemente, la rutina del análisis.
2. Colocar la columna en un tubo cónico nuevo de 1.5ml. Mantener la orientación de la columna correcta. El punto más alto de los medios de gel en la columna y el tubo de recogida a 750 x g durante 2 minutos. Desechar la columna y continuar con el procedimiento de preparación de muestras ABI.
3. Secar la muestra en una centrifuga de vacío. No aplique calor.

Resuspensión del producto de secuenciamiento

1. Pasado el tiempo resuspender en 10 μ l de formamida Hi – Di, homogenizar con el vortex y mantener a 4°C protegido de la luz dar un spin
2. Colocar los tubos para denaturar 95°C por 3 minutos y llevar inmediatamente a hielo por aproximadamente 5 minutos.

- Anexo E:

TAMIZAJE Y TITULACIÓN DE MAT

ESPECIE	SEROGRUPO	SEROVARES	PIURA							LORETO	JAEN	TOTAL
			1A	2B	4A	5A	7B	9A	10A	362	244	
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana								4+ (1/6400)		1
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	3+ (1/400)					2+ (1/200)	2+ (1/800)	2+ (1/800)		4
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	2+ (1/100)									1
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	2+ (1/400)									1
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni								2+ (1/800)		1
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	3+ (1/200)	3+ (1/6400)				2+ (1/100)	2+ (1/100)	2+ (1/200)		5
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica								2+ (1/200)		1
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Georgia								2+ (1/200)		1
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	4+ (1/6400)	4+ (1/6400)	4+ (1/6400)	4+ (1/6400)	3+ (1/6400)	3+ (1/6400)	3+ (1/6400)	3+ (1/400)		8
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	2+ (1/800)									1
<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Alexi	4+ (1/6400)	4+ (1/1600)	4+ (1/3200)	4+ (1/800)	4+ (1/3200)	4+ (1/3200)	4+ (1/800)			7
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	2+ (1/400)									1
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo								2+ (1/800)		1
<i>L. licerasiae</i>	Varillal	Var-010									3+ (1/3200)	1
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	3+ (1/800)		4+ (1/100)							2
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani								3+ (1/800)		1
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Lai	4+ (1/6400)	4+ (1/800)			4+ (1/800)	3+ (1/400)	3+ (1/400)	3+ (1/800)		6
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Coxi								2+ (1/200)		1
TOTAL			10	4	3	3	5	5	5	8	1	

<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo								2+ (1/800)		1
<i>L. licerasiae</i>	Varillal	Var-010									3+ (1/3200)	1
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	3+ (1/800)		4+ (1/100)							2
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani								3+ (1/800)		1
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Lai	4+ (1/6400)	4+ (1/800)		4+ (1/800)	3+ (1/400)	3+ (1/400)	3+ (1/800)			6
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Coxi								2+ (1/200)		1
TOTAL			10	4	3	3	5	5	5	8	1	