



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN EN PRODUCCIÓN
ANIMAL EN ALTIPLANO.

EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE *Leptospira* EN AGUA MEDIANTE
LA DETECCIÓN DE LOS PRECURSORES DE rRNA.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS.

PRESENTA:

ANA LILIA VILLEGAS VÁZQUEZ.

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA. FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN

DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

CD. MX. .MAYO 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Para David Alejandro Rojas Villegas, mi amado hijo:

Mi niño, que esta tesis sirva como testimonio de la perseverancia y tenacidad que tu mami quiere enseñarte. Con todo mi amor para ti Momollo.

“Perdiendo también se gana”

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la posibilidad de realizar todas mis metas profesionales.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por otorgarme la oportunidad de desarrollarme un paso más en el área de la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al proyecto INZ16316.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser mi hogar y la fuente de inspiración para dar lo mejor de mí en el quehacer profesional.

Al CEIEPAA, por recibirme siempre en sus instalaciones y ser origen de los más inesperados retos personales.

A la USEDICO, por abrir sus puertas a los estudiantes con ganas de involucrarse en proyectos de investigación y explorar nuevos horizontes.

Al Laboratorio de Patología Animal de Querétaro, por brindarme un espacio para realizar este trabajo.

A la Dra. Claudia Muñoz Zanzi y al Dr. Eladio B.

A QIAGEN México por la capacitación técnica, el uso de sus equipos e instalaciones, por el espacio brindado para la elaboración la etapa final del trabajo experimental.

Para mi familia: Filiberto Villegas, Blanca Lilia Vázquez, Karla, Jorge, Yael, Yamil, Leonardo, Mario. Porque son mi motor, mi combustible y mi razón.

A mi padre celestial, que me dio la fortaleza en este duro trayecto. Con él todo, sin él nada.

Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por enseñarme el camino, por creer en mí y por ser un mentor paciente. Gracias infinitas y de corazón.

Al GrLLep: amigos queridos, mil gracias por sus enseñanzas Nery, Samantha, Efraín, Vanesa, Dra. Erica Loaiza.

Personal de la USEDICO: Eloy García, Rocío, Daniel; a ustedes por ser un apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A Danyela M, no hay palabras para agradecer todo el apoyo y cariño que me brindaste, me regalaste un pedacito de hogar al formar una pequeña familia.

Para mis compañeras y amigas en el camino de la maestría: Yacky Yurame y Diana Rodríguez.

Mis grandes amigos: Mario Hidalgo Ruíz, Azaf Moreno Torres.

Mis hermanos de hato: Alejandra, Adriana, Angélica, Elena y Erick, siempre mi lado a pesar de la distancia.

José Manuel Carranza, mi paciente maestro te doy las gracias por la dedicación, paciencia y confianza en este trabajo.

Paul Hernández, José Roberto Robles, Dr. Alejandro Enriquez por el apoyo incondicional y las atenciones durante mi estancia en el Laboratorio de Patología Animal.

Personal de la Clínica Veterinaria Quinto Sol: Karen Olivares, Alejandro Ramos, Alan, Alejandra Bonilla... por su participación y apoyo en mis proyectos.

Contenido

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Cuadros	XIII
Resumen	XV
Abstract	XVII
I. Introducción	1
II. Revisión de la literatura	2
Antecedentes históricos de la leptospirosis en México.....	2
Epidemiología e impacto en la salud pública	4
Agente etiológico.....	7
Genética y proteómica de <i>Leptospira</i>	9
Nutrición bacteriana.....	10
Viabilidad bacteriana	11
Supervivencia de <i>Leptospira</i> en el agua	12
Métodos de detección de viabilidad	13
RT-qPCR para detección de precursores de RNA.....	14
Justificación.....	16

Hipótesis	16
Objetivos.....	16
<i>General</i>	16
<i>Específicos</i>	16
III. Material y métodos.....	18
Cepas utilizadas y condiciones de desarrollo.....	18
Determinación de la concentración celular	19
Diseño de iniciadores	19
Validación de los iniciadores para PCR punto final.....	21
<i>Extracción de DNA de cepas de referencia</i>	21
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	22
Extracción de RNA.....	22
<i>Extracción de RNA con Trizol®</i>	22
<i>Extracción de RNA utilizando el producto comercial High Pure RNA Tissue Kit. (Roche®)</i>	23
<i>Extracción de RNA utilizando el producto comercial RNeasy Mini Kit 250 (QIAGEN®) y el equipo automatizado QIAcube (QIAGEN®)</i>	24
Evaluación de la supervivencia de <i>Leptospira</i> en el agua	26
Estimulación nutricional de <i>Leptospira</i> y medición de la expresión de precursores de RNA	27

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	28
RT-qPCR preliminar a partir de las diluciones obtenidas en el ensayo de estimulación nutricional.....	30
Ensayo de cuantificación de pre-RNA para la evaluación de la supervivencia de <i>Leptospira</i>	31
IV. Resultados	34
Determinación de la concentración bacteriana	34
Diseño y validación de los iniciadores	34
Extracción de RNA.....	36
Evaluación de la supervivencia de <i>Leptospira</i> en el agua	37
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	37
qPCR a partir de diluciones de DNA de <i>Leptospira canicola</i> cepa LOCaS46	38
qPCR preliminar a partir de las diluciones obtenidas en el ensayo de estimulación nutricional.....	39
Selección de las muestras problemas	40
Extracción de RNA de <i>Leptospira</i> y cuantificación del material genético.....	40
Curvas de calibración	41
V. Discusión	43
VI. Referencias.....	48
Abreviaturas y siglas usadas	60

Lista de Figuras

Figura 1. Estimulación nutricional de <i>Leptospira</i> y medición de la expresión de precursores de ARN. Síntesis y maduración del rRNA en bacterias. Los Pre-rRNA están estrechamente vinculados con el ensamblaje de los ribosomas y el inicio de la síntesis proteíca. La RT-qPCR pueden diseñarse para dirigirse al pre-rRNA. (Cangelosi and Meschke, 2014).....	15
Figura 2 Secuencia de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad <i>Manilae</i>.	20
Figura 3. Dispositivo QIAcubeHT, equipo automatizado para extracción de material genético.....	25
Figura 4. Cubeta plástica, tubo libre de RNAsas y columna con membrana de sílice	25
Figura 5. Colocación de las muestras en el adaptador (Rotor adapter) en la centrífuga.	26
Figura 6 Distribución al interior del equipo QIAcubeHT.....	26
Figura 7. Tubo con suspensión bacteriana del cual se tomó 1 ml para estimularlo nutricionalmente en 9 ml de medio EMJH modificado. Se colocó 1 ml de suspensión en 9 ml de agua como control no estimulado.	28
Figura 8 Visualización de los productos de PCR del gen 16SrRNA, leptospiras patógenas, (cepa LOCaS46 (en el carril 1) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El tamaño del producto amplificado corresponde a 100 pb	35
Figura 9. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, en donde se observan tres bandas que corresponden a RNA completo de <i>Leptospira</i>	36

Figura 10. Curvas de amplificación de qPCR. Se observa que el control positivo correspondiente a *Leptospira canicola* cepa LOCaS46 amplifica en el ciclo 23 mientras que el control positivo correspondiente a *Hardjobovis* mostró amplificación en el ciclo 24, en contraste con el control negativo que no mostró amplificación..... 37

Figura 11 Curvas de amplificación de qPCR de *Leptospira canicola* cepa LOCaS46. Se observa amplificación de la concentración 1:5 en el ciclo 22, de la concentración 1:25 en el ciclo 24 y de la concentración 1:50 en el ciclo 26..... 38

Figura 12. qPCR a partir de DNA de *Leptospira* cepa LOCaS46. Se observan las muestras incubadas a 30°C amplificando 4 ciclos antes que las de 20°C, lo que coincide con mayor apreciación de material genético 39

Figura 13. Resultados de la curva de calibración por RT-qPCR a partir cDNA del RNA extraído de la cepa LOCaS46 con el gen 16sRNA. El rango dinámico se obtuvo en los ciclos recomendados y con buena distribución entre cada una de las diluciones..... 41

Figura 14. Resultados de la curva de calibración por RT-qPCR a partir cDNA del RNA extraído de la cepa LOCaS46 con el gen 16sRNA. El rango dinámico se obtuvo en los ciclos recomendados y con buena distribución entre cada una de las diluciones..... 41

Figura 15 Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen 16srRNA de leptospiros patógenas. La eficiencia obtenida fue de 0.95 y el valor de la pendiente de -2.5..... 41

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Cepas de <i>Leptospira</i> empleadas	18
Cuadro 2 Diluciones décuples de <i>Leptospira</i> en agua esterilizada en autoclave.....	27
Cuadro 3 Componentes para qPCR.....	28
Cuadro 4 Condiciones para qPCR del gen 16srRNA de leptospiras patógenas.....	29
Cuadro 5. muestras para el ensayo preliminar de qPCR.....	30
Cuadro 6. Componentes para la reacción de RT-qPCR a partir de RNA de <i>Leptospira</i>	31
Cuadro 7. Condiciones del ensayo de RT-qPCR en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN®).....	32
Cuadro 8 Preparación de las reacciones de RT-qPCR para <i>Leptospira</i> . Las muestras se estandarizaron a una concentración de 2.8 ng/μl por reacción, en reacciones de 20 μl	33
Cuadro 9. Concentración de leptospiras por mililitro en cultivo puro de las cepas de trabajo LOCas46, LOVE30 y MOCA45 con 14 días de incubación a 30°C en medio EMJH modificado.....	34
Cuadro 10 Características de los iniciadores para detección del gen 16s rRNA de leptospiras patógenas.....	35
Cuadro 11 Criterios para la selección de muestras para evaluar la supervivencia de <i>Leptospira</i> en agua mediante la detección de precursores de rRNA (Pre-RNA) mediante RT-qPCR.....	40

Cuadro 12 Cuantificación del número de copias del gen 16srRNA de Leptospira de las cepas LOCaS46, LOVE30 y MOCA45, de muestras con 1 y 30 días de incubación en agua a una concentración de 7×10^6 , con tres horas de estimulación nutricional..... 42

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad aguda y febril considerada actualmente la zoonosis de mayor distribución mundial y de reporte obligatorio en muchos países, está asociada al riesgo profesional, siendo los más afectados los médicos veterinarios, agricultores y empleados de mataderos. Esta enfermedad constituye un importante problema en la Salud Pública, tanto en países en vías de desarrollo como en los países desarrollados. Dependiendo de las condiciones, las leptospiras pueden sobrevivir desde unas cuantas horas en poca humedad hasta seis meses en agua estancada en inundaciones, a temperatura ambiente con un pH de 7.2 a 8.0 (bajo condiciones de laboratorio). La supervivencia en agua de río es más corta, pero es prolongada a bajas temperaturas, sin embargo en agua potable disminuye el tiempo de supervivencia a pocas horas. El lento crecimiento de las leptospiras patógenas ha impedido el uso eficaz de las técnicas habituales de bacteriología para el diagnóstico de leptospirosis, por lo que se han empleado técnicas moleculares que resultan más sensibles para su detección o bien métodos indirectos para la detección de anticuerpos específicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta rápida, sensible y específica, sin embargo, esta técnica no logra hacer una diferenciación entre bacterias viables y no viables. Con el fin de detectar la viabilidad de *Leptospira* en agua, se desarrolló un ensayo para la detección de los precursores de rRNA bacterianos (prerRNA), que se encuentran en las leptospiras metabólicamente activas. Se utilizaron cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46, serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai*

serovariedad Tarassovi cepa MOCA 45, las cuales fueron cultivadas en 6 ml de medio EMJH líquido modificado, se incubaron a 30°C hasta alcanzar la fase estacionaria, se cuantificaron con una cámara de Petroff-Hausser. Se prepararon dos juegos de diluciones incubándose a 20 °C y 30°C. Se realizó la evaluación de la supervivencia mediante la detección de precursores de rRNA a los 3 y 30 días de incubación. La estimulación nutricional de las leptospiras en dilución se llevó a cabo con 9 ml de medio EMJH modificado, durante 3, 6 y 18 horas. Se realizó la extracción de RNA de las muestras estimuladas y se empleó el ensayo de qPCR para la detección de pre-rRNA, los iniciadores Lepto-F1 (5'AAATTGCCCGCAAGGGTA 3') y Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGACTTG 3'), específicos para el gen 16sRNA. La detección de pre-rRNA se correlaciona con la viabilidad de *Leptospira* debido a su capacidad para sintetizar dichos precursores en respuesta a un breve estímulo nutricional que es exclusiva de las bacterias metabólicamente activas. Se observó una mayor cantidad de material genético en las muestras incubadas a 30°C, con una concentración bacteriana de 10⁶ con tres horas de estimulación nutricional, en contraste con las muestras no estimuladas.

Palabras clave: *Leptospira*, viabilidad, RT-qPCR, pre-RNA, 16sRNA, extracción de RNA

Abstract

Leptospirosis is an acute disease, currently considered the zoonosis with the highest global distribution and of obligatory report in many countries. It is associated with professional activities such as veterinarians, farmers and slaughterhouse employees. This disease constitutes an important problem in public health, both in countries in route of development *and* developed countries, Depending on the conditions, leptospira can survive from a couple of hours in few humidity to six months in stagnant water in floods. Leptospiras remain viable in the water at ambient temperature with a pH from 7.2 to 8.0 (under laboratory conditions). Survival in lake water is shorter but is prolonged in low temperatures, in potable water survivability time decreases to only a few hours. The slow growth of *Leptospira* in liquid and solid mediums, summed to their slow metabolism, have hindered the efficient use of habitual technics of bacteriology for their diagnostic, therefore molecular technics have been employed, that result more sensitive for their detection. Polymerase chain reaction (PCR) is a fast tool, sensitive and specific, nevertheless, this technic does not achieve to make a differentiation between viable and non- viable bacteria. In order to better the specificity of the PCR for the determination of viability of *Leptospira*, A test was developed for the detection of the bacterial rRNA (prerRNA) precursors, which are found in metabolically active leptospiras. Strains were used of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strain LOCaS46, serovar *Icterohaemorrhagiae* strain LOVe30 and *Leptospira santarosai* serovar *Tarassovi* strain MOCA 25, which were

cultivated in 6 ml of EMJH modified liquid medium, they were incubated at 30°C until reaching stationary phase (14 days approximately), and were quantified with a Petroff-Hausser counting chamber. Two sets of incubating dissolutions were prepared, in the first case, at 20 °C and the second at 30°C. Evaluation was made of survivability through the detection of rRNA precursors at 3 and 30 days of incubation. The nutritional stimulation of the leptospiras' in dissolution was carried out with 9 ml of modified EMJH medium, during 3, 6 and 18 hours. The RNA extraction was made from the stimulated samples and was employed like a template qPCR test for the detection of pre-rRNA, in which the initiators Lepto-F1 (5'AAATTGCCCGCAAGGGTA 3') were used and Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGACTTG 3') specifically for gen 16sRNA. Pre-rRNA detection correlates with the viability of *Leptospira* due to the capability of synthesizing a macromolecule in response to a brief nutritional stimulation that is exclusive to metabolically active bacteria. A larger quantity of genetic material was observed in the samples incubated at 30°C, with a bacterial concentration of 10⁶ with three hours of nutritional stimulation. The use of the specific initiators for gen 16sRNA increases analytic sensibility of qPCR when detecting viable Leptospiras.

Keywords: *Leptospira*, vability, RT-qPCR, pre-RNA, 16sRNA, RNA extraction.

I.Introducción

La leptospirosis es una enfermedad aguda y febril considerada actualmente la zoonosis de mayor distribución mundial y de reporte obligatorio en muchos países, siendo además una enfermedad re-emergente que afecta al humano y a prácticamente todos los mamíferos tanto domésticos como silvestres, incluidos mamíferos marinos (Solano *et al.* 1996; Haake and Levett, 2015). Fue descrita por primera vez en el hombre en 1886 y en caninos en 1899 (Weil, 1886; Zunino y Pizarro, 2007). Esta enfermedad es ocasionada por bacterias patógenas del género *Leptospira*, en humanos se estiman más de medio millón de nuevos casos de leptospirosis al año a nivel mundial, la incidencia se encuentra en un rango de 0.1 a 1 por cada 100,000 habitantes en climas templados y de 10 a 100 en climas tropicales, cuando surgen brotes la incidencia de casos sobrepasa los 100 por cada 100,000 habitantes (Hartskeerl *et al.*, 2011) y de estos la mortalidad puede exceder el 10% (OMS, 2008; Sikkema *et al.*, 2010; Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group, 2010).

La enfermedad se ha registrado en una gran variedad de especies domésticas que incluyen a los perros, caballos, bovinos, cerdos y no muy frecuentemente en ovejas y cabras; además del potencial riesgo de contagio, se debe considerar la importancia del impacto económico a causa de las fallas reproductivas y/o muerte que ocasiona la enfermedad en los animales (Wendy *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2008).

La leptospirosis es considerada una zoonosis de riesgo profesional, siendo los más afectados los médicos veterinarios, agricultores y empleados de mataderos.

Se puede transmitir directa o indirectamente, entre animales, o de los animales a las personas. La forma directa se produce al entrar en contacto con orina, sangre, tejidos u órganos de animales o fetos infectados, mientras que la forma indirecta es la más frecuente, donde el agua juega un papel primordial, ya que las leptospiras provenientes de terrenos o agua contaminada con orina de animales enfermos ingresan al organismo a través de la mucosa oral, conjuntival, nasal o genital; así como a través de la piel con laceraciones o reblandecida por la humedad. Las tasas de transmisión son muy elevadas ya que sólo diez microorganismos son necesarios para causar la enfermedad (Aviat *et al.*, 2009; Musso y La Scola, 2013). La leptospirosis constituye un importante problema en la salud pública, debido a la incidencia cada vez mayor, tanto en países en vías de desarrollo como en los países desarrollados; es más común en áreas tropicales y subtropicales con altos índices de precipitación. La enfermedad está incluida dentro de la lista B de la Organización Mundial de la Salud Animal (O.I.E.), estando por ello obligados los países miembros a realizar un informe mensual y/o anual (Andicoberry *et al.*, 2001).

II. Revisión de la literatura

Antecedentes históricos de la leptospirosis en México

Los primeros estudios en México fueron realizados por Noguchi y Klieger en Yucatán. En 1919. Noguchi comenzó por examinar enfermos diagnosticados por los médicos locales, que coincidían con casos de fiebre amarilla. A todos los pacientes les practicó frotis de sangre pero sólo en un caso encontró formas semejantes a leptospiras (Noguchi and Klieger, 1920). Debido a los cuadros

clínicos, se convenció de que esta enfermedad si era fiebre amarilla, limitándose entonces a impartir una conferencia sobre leptospirosis y retirándose a fines de enero de 1920.

En México, los estudios sobre leptospirosis se han encaminado principalmente a la detección de anticuerpos contra las diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*. En 1921 Pérez Grovas aisló, en Veracruz, *Leptospira* de pacientes considerados como casos de fiebre amarilla. En 1928, también en Veracruz, Castañeda cultivó leptospiras a partir de muestras de *Rattus norvegicus*. Gastélum, en Mazatlán (Pérez, 1923), refirió la existencia de leptospirosis en los litorales mexicanos, seis años después; Bustamante describió tres casos de la enfermedad de Weil, uno de ellos serológicamente por Bauer, en Nueva York. (Bustamante, 1932; Colín *et al*, 2004).Varela y colaboradores, a partir de 1930 y hasta 1969, realizaron varios trabajos que abarcan estudios en humanos, así como en algunas especies animales en diferentes partes de la República Mexicana (Varela *et al.*, 1958; Carrada *et al*, 2002).

Los estudios de sueros ictéricos se iniciaron en México con Mendoza (1958), en pacientes del Hospital de la Raza del IMSS. Valera *et al.* (1961) encontraron, en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la SSA el 2.8% de seropositividad en 282 sueros de habitantes de Mérida (Varela y Zavala, 1962). Entre 1930 y hasta 1969, el grupo de Valera realizó diversos trabajos que incluyen estudios en animales domésticos resaltando la importancia de los mismos en la epidemiología de la enfermedad, ya que pueden sustituir al reservorio natural para los humanos no sólo en el área rural, sino también en la urbana. La leptospirosis

no tenía reporte en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en México, fue hasta el año 2000 cuando se inició su registro de manera continua en el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedad sujetos a Vigilancia Epidemiológica (Velasco-Castrejón, 2007).

Epidemiología e impacto en la salud pública

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial reconocida como causante de síndromes febriles indiferenciados, se reporta una mayor incidencia en regiones tropicales, su transmisión ocurre con mayor frecuencia en zonas donde hay expansión poblacional, especialmente en países en vías de desarrollo. (Picardeau, 2013). Tradicionalmente, la leptospirosis es considerada como una enfermedad ocupacional asociada principalmente con las actividades relacionadas con la agricultura, el mantenimiento del alcantarillado y la cría de algunos animales; se transmite a través del contacto con la orina, agua o tierra contaminada con orina de animales infectados, tales como roedores, perros y ganado (Ochoa *et al.*, 2000; Vinetz *et al.*, 1996).

Cuando la orina de animales infectados o fuentes de agua contaminadas con *Leptospira* entran en contacto con la piel lesionada, reblandecida por humedad o con alguna superficie mucosa tanto de animales susceptibles como de hospederos accidentales como el humano, se produce la infección que puede tener una presentación aguda o crónica y cursar con una amplia variedad de signos clínicos (dependiendo de la especie que es afectada) que pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades de tipo febril, los cuales incluyen la infertilidad, aborto, pérdida de peso, ictericia, disminución de la producción láctea, signos asociados a

insuficiencia hepática o renal, neumonía y meningitis.(Ellis, 1986; Picardeau, 2013; Zúñiga-Carrasco *et al.*, 2013).

El período de incubación de la enfermedad puede ser de 2 hasta 30 días, siendo lo usual entre 5 y 14 días. Se caracteriza por la presentación de dos fases, la leptospiremia que dura de 7 a 10 días y la leptospiruria que dura de una semana a varios meses o años. La puerta de entrada común de *Leptospira* es a través de las mucosas, abrasiones, heridas en la piel, entre otras. También se mencionan la mucosa oral y del tracto respiratorio debido a la ingesta e inhalación de agua o aerosoles contaminados (Ochoa *et al.*, 2000; Adler and De la Peña, 2010). La diseminación de la enfermedad hacia huéspedes susceptibles depende de factores como clima, densidad de población, condiciones de higiene, grado de infraestructura sanitaria y grado de exposición con huéspedes de mantenimiento principalmente. Diferentes especies de roedores pueden ser reservorios de distintas serovariedades, pero está aceptado que la rata gris o noruega (*Rattus norvegicus*) es hospedero de mantenimiento del serogrupo Icterohaemorrhagiae, así como el ratón lo es para la serovariedad Ballum. (Aviat *et al.*, 2009; Zúñiga y Caro, 2010; Picardau, 2013). Las condiciones climatológicas en mayor o menor grado pueden favorecer su supervivencia, ya que el rango de temperatura óptima de la bacteria en el medio ambiente es de 28°C a 32°C en aguas no salinas con un pH ligeramente alcalino de 7.2 a 8.0. (Adler, 2015). Dependiendo de las condiciones, las leptospiras pueden sobrevivir desde unas cuantas horas en poca humedad hasta seis meses en agua estancada en inundaciones (Stoddard, 2014). Si bien, el impacto se aprecia con mayor frecuencia en áreas tropicales y

subtropicales donde la enfermedad se manifiesta todo el año, también en áreas templadas se presenta en forma estacional durante los meses en que se registran altas temperaturas y lluvias (primavera-verano); en las regiones áridas debido a las condiciones propias se presenta cerca de sitios donde existe agua y una alta densidad de animales. (Stoddard *et al.*, 2014; Wynwood *et al.*, 2014).

Respecto a los factores de riesgo independientes del medio, cabe destacar el tipo de crianza ganadera, si se considera que en los bovinos, los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes y de peor pronóstico en las unidades de producción de leche, que en aquellas dedicadas a la crianza de bovinos productores de carne (Andicoberry *et al.*, 2001; Adler and De la Peña Moctezuma 2010). Esto es debido principalmente, a que el ganado bovino lechero se cría por lo general en sistema intensivo o semiextensivo que implica un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión. Además, en el caso de bovinos productores de leche, las crías suelen separarse de las madres tras el parto, manteniéndose aisladas del hato e introduciéndolas en el núcleo del mismo, hasta su primera gestación. Esto supone la introducción de animales no expuestos, totalmente susceptibles a la infección y que pueden infectarse en los momentos de mayor riesgo, haciendo que las tasas de la enfermedad más altas se produzcan entre los 2-3 años de edad (Smith *et al.*, 1997).

A diferencia de lo que sucede en otras especies animales, en los bovinos son más comunes los abortos y la existencia de portadores renales (Ellis, 2004).

El aborto en la leptospirosis bovina se puede considerar como una secuela crónica de la infección, que se produce semanas después de la leptospiremia, con títulos de anticuerpos en fase descendente y muchas veces por debajo de niveles

detectables (Smith *et al.*, 1997). En los casos de aborto, es recomendable tomar muestras de suero tanto de la hembra abortada como del producto abortado para realizar los análisis serológicos. La determinación de anticuerpos fetales tiene un gran interés, dado que los anticuerpos maternos no pasan la barrera placentaria y en consecuencia no hay interferencias con reacciones vacunales. El aborto ocurre, generalmente en el último tercio de gestación, de seis a doce semanas después de la leptospiremia inicial (Andicoberry *et al.*, 2001).

La leptospirosis bovina actualmente es reconocida en todo el mundo causando grandes pérdidas económicas. En México, existen reportes de aislamiento de la serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno a partir de un feto bovino en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo (Dorantes, 1985; Morales *et al.* 2004), así como de las serovariedades Hardjoprajitno, Tarassovi, Grippytyphosa y Mini a partir de tejido renal de bovinos en los estados de Tabasco y Estado de México (Carmona *et al.*, 2011).

Agente etiológico

Las leptospiras son espiroquetas que pueden ser microorganismos saprófitos del agua o pueden ser patógenas causando infecciones en los animales (Mitsumasa *et al.*, 2013). El género *Leptospira* pertenece a la familia Leptospiraceae del orden Spirochaetales y está conformado por espiroquetas de 6 a 20 μm de longitud, las cuales muestran un gancho en uno o ambos extremos. Los miembros de la familia Leptospiraceae son de forma espiralada, alargados, delgados, con alta motilidad. Para su visualización es necesario utilizar el microscopio de campo oscuro (Levett, 2001). Estos microorganismos poseen una membrana citoplasmática, una capa delgada de peptidoglicano, un espacio periplásmico y una membrana externa, la

estructura de su pared es similar a la de una bacteria Gram negativa (Ko *et al.*, 2009). Presentan tres tipos de movimientos: de translación, de rotación sobre su propio eje y de contorción. Esta movilidad se debe a la presencia de un par de flagelos periplásmicos o endoflagelos localizados entre la capa de mureína (peptidoglicano) y la membrana externa. La membrana externa contiene lipopolisacárido (LPS), de organización estructural similar al de las bacterias Gram negativas pero con una menor actividad endotóxica. Las leptospiras son consideradas bacterias aerobias estrictas aunque se pueden desarrollar también en condiciones microaerófilas (Adler and De la Peña Moctezuma, 2010). Existen poco más de 260 serovariedades patógenas diferenciadas con base en la composición y estructura antigénica de sus LPS. Actualmente se consideran 22 especies de las cuales 16 son especies patógenas o intermedias (Nascimento *et al.*, 2004; Morey *et al.*, 2006).

Entre las especies patógenas y saprófitas, hay alrededor de 2,052 genes comunes que constituyen el núcleo del genoma. Está demostrado que las categorías funcionales del ADN y el metabolismo del ARN, así como el procesamiento / secreción de las proteínas y el mantenimiento celular se han conservado a través de las diversas especies. Sin embargo, la especie saprofita, *L. biflexa*, contiene un tercer replicón circular que está ausente en las especies patógenas. La mayoría de los genes presentes en el replicón se asocian a la naturaleza ambiental y la adquisición de nutrientes. Debido a que estas especies dependen del medio ambiente y no de un organismo hospedero, es imperativo que las especies saprófitas tengan los genes necesarios para codificar los diferentes mecanismos necesarios para adaptarse a los diversos ambientes (Saint Girons *et al.*, 2000).

Las diferencias también pueden verse en los métodos de transmisión de diferentes especies patógenas. Por ejemplo, *L. interrogans* puede transmitirse de animal a animal a través del contacto directo con orina infectada o agua contaminada. Este método de transmisión requiere que el microorganismo esté en el medio ambiente durante largos períodos entre huéspedes mamíferos. Por otra parte, *L. borgpetersenii*, otra especie patógena, no puede sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente y por lo tanto tiene un método de transmisión mucho más directo que el de *L. interrogans*. (Bulach *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Adler and De la Peña Moctezuma, 2010).

Genética y proteómica de *Leptospira*

El tamaño del cromosoma de *Leptospira* varía de acuerdo a la especie, se encuentra en un rango de 3.9-4.6 Mb, con un contenido de G+C de 35 a 41%, poseen dos cromosomas circulares. En la serovariedad Lai, el cromosoma pesado es de 4,332,241 pb y el ligero de 358,943 pb; fue la primera serovariedad de este género bacteriano en ser secuenciado. Actualmente, se conocen las secuencias de los genomas de las serovariedades Lai y Copenhageni de *L. interrogans*, dos cepas de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo y dos cepas de *L. biflexa* serovar Patoc (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004; Bulach *et al.*, 2006). Se han identificado más de 30 copias de secuencias de inserción (IS). Se obtuvo la predicción genética de cuatro, 768 posibles genes: 37 genes para ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) y cuatro genes para ácido ribonucleico ribosomal 16S (rrs). El número de genes de tRNA puede explicar el desarrollo lento de *Leptospira interrogans in vitro*.

La especie saprófita, *L. biflexa*, posee un tercer replicón circular de 74 kb que no está presente en las patógenos. La proporción de genes que codifican proteínas es desconocido (Bulach *et al.*, 2006).

Nutrición bacteriana

Los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de *Leptospira* involucran fuentes de carbono, nitrógeno, además de vitaminas y suplementos nutricios (Adler and De la Peña, 2010). Los ácidos grasos de cadena larga representan una fuente de carbono esencial para el crecimiento de las leptospiras, estos ácidos grasos pueden ser nocivos por lo que es necesaria la adición de desintoxicantes como el polisorbato (Tween 80) al medio enriquecido con suero. (Faine *et al.*, 1999). El glicerol como fuente de carbono adicional aumenta el desarrollo de algunas leptospiras. Los iones de amonio son la única fuente de nitrógeno reconocido y se pueden suministrar ya sea como sales de amonio o por la desaminación de los aminoácidos (Shenberg, 1967). Otros nutrientes importantes incluyen la tiamina, biotina (para algunas cepas), fosfato, calcio, magnesio, hierro y compuestos adicionales que se agregan de forma rutinaria al medio de cultivo, en particular para el aislamiento y mantenimiento de leptospiras patógenas (Shenberg, 1967; Zuerner, 2005; Haake, 2006). La vitamina B12 se ha considerado un nutriente esencial para el desarrollo de las especies patógenas de *Leptospira* a 30°C., sin embargo, la secuenciación del genoma ha revelado la presencia de un operón completo de la biosíntesis de la vitamina B12 dentro de leptospiras patógenas, y por lo tanto la adición de este nutriente a los medios de cultivo in vitro podría ser innecesario (Nascimento *et al.*, 2004).

Viabilidad bacteriana

La viabilidad se define como la capacidad de una bacteria de sobrevivir y multiplicarse, ésta característica ha sido determinada por la habilidad para desarrollarse y formar colonias en medios de cultivo en el laboratorio o por su aislamiento a partir de muestras biológicas. Sin embargo, un gran número de microorganismos del suelo y del agua, aún no han podido ser cultivados. Estudios recientes han demostrado la habilidad de algunas bacterias para subsistir en un estado llamado viable no cultivable, el cual tiene importancia en la industria alimenticia y la salud pública. (Tamagnini y Paraje, 20015). Estas bacterias están vivas, con actividad metabólica, pero no pueden desarrollar colonias en condiciones de cultivo en que las que habitualmente podrían crecer; se le considera un estado de inactividad, (Oliver, 2005, Oliver, 2010, Pinto *et al.*, 2014). En el estado no cultivable, la bacteria vegetativa normal no sólo cambia morfológicamente, sino también metabólicamente modificando la expresión de sus genes y su potencial de virulencia (Li *et al.*, 2014). Bajo determinadas condiciones las bacterias pueden abandonar este estado. Debido a su falta de desarrollo en los medios de cultivo, muchas veces se subestima la concentración real microorganismos (Ramamurthy *et al.*, 2014).

Muchas especies bacterianas potencialmente patógenas sobreviven y persisten en alimentos procesados, leche pasteurizada, agua potable y en el ambiente en general (Sardessai, 2005). Bacterias patógenas causantes de gastroenteritis (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*), tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) o leptospirosis, pueden encontrarse en estado viable

pero metabólicamente inactivo y recuperar posteriormente su virulencia después de someterlas a condiciones favorables como, por ejemplo, la estimulación nutricional (Du *et al.*, 2007).

Supervivencia de *Leptospira* en el agua

Las leptospiras permanecen viables durante varios meses en el agua a temperatura ambiente con un pH de 7.2 a 8.0 (bajo condiciones de laboratorio). La supervivencia en agua de río es más corta pero es prolongada a bajas temperaturas. En agua potable disminuye el tiempo de supervivencia a pocas horas; en tierra ácida (pH 6.2) sobreviven por siete semanas, en lodo por lo menos tres semanas. También se piensa que los residuos de los detergentes han reducido la supervivencia de *Leptospira* en los desagües, pues se inhiben a bajas concentraciones de detergente. Cuando la tierra se humedece con agua contaminada con la orina de animales infectados, la espiroqueta puede sobrevivir durante aproximadamente dos semanas. (Ellinghausen, 1973; Ganoza *et al.*, 2006; Mitsumasa *et al.*, 2013; Stoddard *et al.*, 2014).

La *Leptospira*, similar a otras espiroquetas, se adapta rápidamente a ambientes viscosos, en los cuales incrementa su movilidad con respecto a otras bacterias. Inclusive, algunos autores hacen referencia al fenómeno de viscotaxis para *Leptospira* (Barragán *et al.*, 2011). En contraparte Trueba (Trueba *et al.*, 2004) comprobó que cuando las leptospiras patógenas eran mantenidas en agua destilada (pH 7.2), estas permanecían viables durante 110 días, sin embargo, cuando estas fueron mantenidas en el mismo tipo de agua a la cual se le agregó 0.5 % de agarosa purificada, se triplicó el tiempo de supervivencia (347 días). La

observación en microscopio de campo oscuro de estos cultivos reveló un patrón de agregación que no fue afectado por la carencia de nutrientes. Es posible que en el ambiente, al entrar en contacto con fuentes de agua, *Leptospira* pueda tener afinidad para detectar la viscosidad formada por componentes de naturaleza polisacárida o biopelículas de otros microorganismos sobre los cuales esta espiroqueta logre formar agregados. De esta forma, podría sugerirse que la agregación de leptospiras es un mecanismo de protección en ambientes acuosos, que favorece su persistencia en este tipo de nichos, tal como sucede cuando éstas se cultivan en medios semisólidos. (Rawlins *et al.*, 2014; Wójcik-Fatla *et al.*, 2014; Wynwood *et al.*, 2014).

Métodos de detección de viabilidad

Los métodos analíticos basados en la detección de material genético que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los análisis metagenómicos, nos han permitido conocer la diversidad microbiológica en las muestras ambientales, sin embargo, estos métodos proporcionan información limitada sobre el estado fisiológico de las bacterias. El estado metabólico de una bacteria, es fundamental para determinar su viabilidad y este no puede ser evaluado por los métodos tradicionales basados en la detección de DNA, ya que la detección de ácidos nucleicos no permite distinguir entre el DNA de una bacteria viable y el DNA de una bacteria inactivada.

Se han desarrollado estrategias alternativas basadas en la PCR, una de ellas correlaciona viabilidad bacteriana con la integridad de la envoltura celular, en ella las muestras bacterianas son incubadas con un reactivo fotosensible llamado

Propidio de Moniazida (PMA) que se une al DNA libre o expuesto de las membranas dañadas inhibiendo las reacciones de amplificación por qPCR, lo que permite sólo la amplificación de las bacterias con membranas integras (viables). (Nocker *et al.*, 2006).

Otra de las estrategias, es la denominada "prueba de viabilidad molecular" (MVT), la cual correlaciona la viabilidad con la capacidad de sintetizar rápidamente una macromolécula (un precursor de rRNA específico de especie, o pre-rRNA) en respuesta a un estímulo nutricional (Cangelosi *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2014). La síntesis del pre-rRNA tras la estimulación nutricional se detecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-qPCR) del pre-rRNA (Cangelosi and Meschke, 2014).

RT-qPCR para detección de precursores de RNA

Con el fin de mejorar la especificidad de la PCR para la determinación de la viabilidad microbiana, se han desarrollado ensayos para detectar los precursores de rRNA bacterianos (pre-rRNA). Los pre-rRNAs son intermedios en la síntesis de rRNA que se eliminan enzimáticamente para producir rRNA maduro (figura 1). En las bacterias metabólicamente activas, los pre-rRNAs pueden ser el 25% del total de rRNA celular (Oerther *et al.*, 2000). El RNA precursor (pre-RNA), también denominado ARN nuclear heterogéneo (hnRNA), es un marcador útil para el metabolismo celular y la tasa de desarrollo. El fundamento en la RT-qPCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de un gen de interés. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la RT-qPCR será proporcional a la cantidad de ADN

(cDNA) previamente sintetizado y amplificado. En general, para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón bajo las mismas condiciones, para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. El ensayo de RT-qPCR se puede utilizar para cuantificar los pre-rRNA específicos y permite distinguir entre la cantidad de pre-RNAs provenientes de células metabólicamente activas de una muestra estimulada con nutrientes específicos en relación con un control no estimulado. Además de excluir la señal de fondo de células no viables y de ADN libre (Menéndez *et al.*, 2005; Cangelosi *et al.*, 2010; Gentilini *et al.*, 2015; Cangelosi and Meschke, 2014; Castillo, 2014).

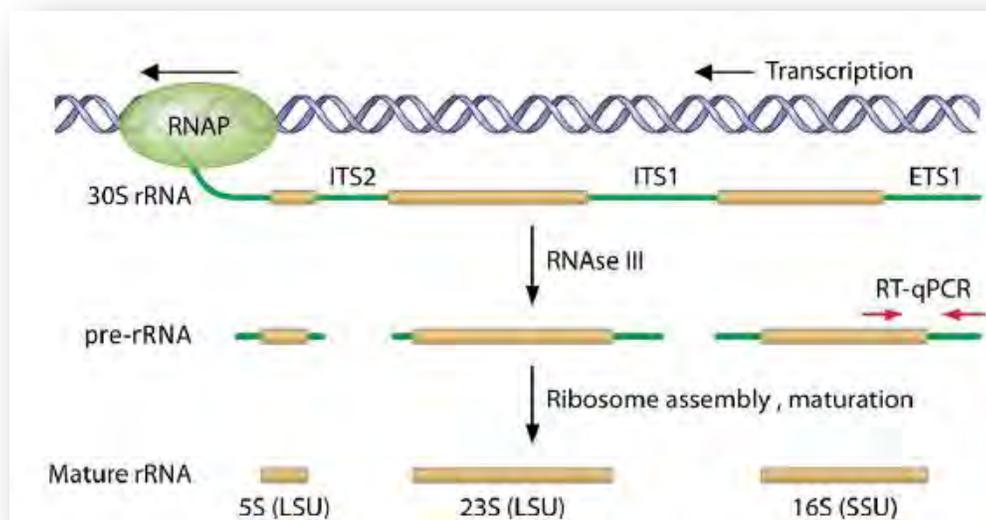


Figura 1. Estimulación nutricional de *Leptospira* y medición de la expresión de precursores de ARN. Síntesis y maduración del rRNA en bacterias. Los Pre-rRNA están estrechamente vinculados con el ensamblaje de los ribosomas y el inicio de la síntesis proteica. La RT-qPCR pueden diseñarse para dirigirse al pre-rRNA. (Cangelosi and Meschke, 2014).

Justificación

Dadas las limitaciones de las pruebas convencionales para la detección de leptospiras en muestras ambientales, es necesaria la búsqueda de una alternativa que permita, no sólo evaluar su presencia, sino su viabilidad en el agua. La técnica de RT-qPCR para la detección de precursores de rRNA (pre-rRNA) es una herramienta que permite detectar la viabilidad de las leptospiras cultivadas en agua.

Hipótesis

La concentración de precursores rRNA (Pre-RNA) de *Leptospira* será superior en muestras de agua adicionada con nutrientes que en muestras de agua sin la adición de nutrientes como resultado de la activación del metabolismo, permitiendo distinguir la viabilidad bacteriana.

Objetivos

General

Demostrar el aumento de precursores de rRNA (pre-rRNA) de *Leptospira* cultivada en agua, por activación de su metabolismo tras la adición de nutrientes, utilizando la RT-qPCR.

Específicos

- Cultivo de las cepas de trabajo.
 - Determinación de la concentración celular de las cepas de trabajo.
- Diseño de iniciadores para el gen 16srRNA.
 - Extracción de DNA de las cepas de trabajo.

- Validación de los iniciadores para el gen 16srRNA.
- Selección de un método para extracción de RNA.
- Estandarización de la prueba de RT-qPCR para la detección de pre-rRNA.
- Evaluación de la supervivencia de *Leptospira* en el agua posterior a la estimulación nutricional y la medición de la expresión de pre-rRNA.

III. Material y métodos.

Cepas utilizadas y condiciones de desarrollo

Se utilizaron tres cepas: *Leptospira interrogans*: serovariedad Canicola cepa LOCaS46 y serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa LOVE30 y *L. santarosai* serovariedad Tarassovi cepa MOCA 45, las cuales se cultivaron en 6 ml de medio EMJH líquido modificado, a 30°C hasta alcanzar la fase estacionaria (en un rango de 12 a 14 días aproximadamente), que se apreció con la aparición de turbidez en el medio de cultivo (10^7 - 10^8 leptospiras/ml). Posteriormente, se realizó su cuantificación con una cámara de Petroff-Hausser mediante observación microscópica en campo oscuro.

Las cepas correspondieron a aislados de campo: de perro (LOCaS46), de rata (LOVe30) y de bovino (MOCA45), las cuales se encuentran resguardadas en el laboratorio de bacteriología de la Unidad de Servicio de Diagnóstico y Constatación (USEDICO), del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de *Leptospira* empleadas

Especie	Serovariedad	Cepa	Origen	Referencia
<i>L. interrogans</i>	Canícola	LOCaS46	Riñón de perro	Castillo, 2008
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	LOVe30	Riñón de rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	Montes de Oca y Castillo, 2009.
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	MOCA45	Riñón de bovino	Carmona <i>et al.</i> , 2014

Determinación de la concentración celular

Se realizó mediante conteo con la cámara de Petroff- Hausser (Hausser Scientific Company, USA), en microscopio de campo oscuro (Zeiss), con aumento de 400x. Se tomó una gota de cultivo en medio EMJH con 12 días de incubación a 30°C y se evaluó el número de leptospiras por mililitro.

El conteo se realizó en 5 cuadros de la cámara, siguiendo instrucciones del fabricante; las lecturas se llevaron a cabo por triplicado y se trabajó con la media aritmética. La fórmula aplicada para determinar la concentración del cultivo fue la siguiente:

$$(\# \text{ de leptospiras en 5 campos})/5 = \text{leptospiras/ mm}^3$$

$$(\text{Leptospiras/mm}^3) (1000) = \text{leptospiras/cm}^3 (\text{ml})$$

Tomando en cuenta que el volumen de la cámara es de 0.02 mm³

Diseño de iniciadores

El diseño de iniciadores se realizó tomando como referencia las secuencias de la región conservada del gen 16srRNA de *Leptospira interrogans* disponibles en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=leptospira>) (Figura 2). Posteriormente, se revisó la homología cruzada con un alineamiento basado en método de palabras BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) basado en las secuencias de *Leptospira* disponibles en la base de datos.

```

>gb|CP011934.1|:1189000-1190581 Leptospira interrogans serovar Manilae
strain UP-MMC-NIID HP chromosome 1, complete sequence
CGAGTAATCTTGTGAAATAAGGAATTCAGCTCTAGTAGAAAAAATTGCCCGCAAGGGTAATTCAACAC
GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACTAACGCTGGCGGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGC
AAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAATCTTCCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCG
AAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCAGAGATCATAAGATTTTTCCGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATG
AGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCTGAGA
GGGTGTTCCGCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGC
TCAATGGGGGAACCCCTGAAGCAGCGACGCCCGTGAACGATGAAGGTTCTTCGGATTGTAAGTTCAGTA
AGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCCGGTAATACGTATGGTCAAGCGTTGTTCCGAATCATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGACATGT
AAGTCAGGTGTGAAACTGCGGGCTCAACTCGCAGCCTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAG
AGGCAAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CTTGCTGGCCTAAAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAAT
CCACGCCCTAAACGTTGTCTACCAAGTTGTTGGGGTTTTAAACCCCTCAGTAACGAACCTAACGGATTAAGT
AGACCGCTGGGGACTATGCTCGCAAGAGTGAAGTCAAAGGAATTGACGGGGTCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCTTGACATGGAGTGGAAATCATGTAGA
GATACATGAGCCTTCGGGCCGCTTCACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCACCTTATGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCGTAAGGAACT
GCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACA
CGTGCTACAATGGCCGTACAAAGGGTAGCCAACTCGCGAGGGGGAGCTAATCTCAAAAATCCGGTCCCA
GTTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGACCTTGTACACACCCCGTACACCACCTGAGTGGGGAGCACCCGAAAGTGGT

```

Figura 2 Secuencia de *Leptospira interrogans* serovariedad *Manilae*.

Utilizando la herramienta ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), se analizaron alineamientos múltiples de las secuencias, de forma comprensible desde un punto de vista biológico. Se calculó el mejor emparejamiento de las secuencias seleccionadas y se apreciaron los fragmentos idénticos, similares y diferentes.

Los iniciadores fueron diseñados para acoplarse a la terminación 5' y reconocer las secuencias en el rRNA maduro utilizado para la RTq-PCR.

Validación de los iniciadores para PCR punto final

Extracción de DNA de cepas de referencia

Se emplearon 10 ml de cultivo puro de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa LOVE30, *Leptospira interrogans* serovariedad Canícola cepa LOCaS 46 y *Leptospira santarosai* serovariedad Tarassovi cepa MOCA 45 en medio EMJH modificado. El cultivo se colocó en tubos estériles de polipropileno (Nalgene®) y fue centrifugado a 12,000 xg/10 min en refrigeración. Por cada 100 ml de cultivo, se agregaron 400 µl de buffer TE y 22.5 µl de SDS al 10%. Se agregaron 2.25 µl de proteinasa K (Roche®) para después incubar a 37 °C en baño María durante una hora. Posterior a la incubación, se adicionaron 100 µl de NaCl 5M, 68 µl de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) precalentado a 65°C a baño maría, se homogenizó con pipeta y se incubó a 65°C por 20 minutos. Se añadieron 550 µl de alcohol isoamílico (JT Barker)-cloroformo (JT Baker®) con una relación 1:24, se homogenizó en agitador electrónico (Vórtex) por 20 segundos y se centrifugó en refrigeración a 10,000 xg por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo, el DNA se precipitó con 300 µl de isopropanol (JT Baker®), mezclando por inversión hasta que el DNA se precipitó. Finalmente, el tubo se centrifugó en refrigeración a 10,000 xg durante 5 minutos para recuperar el DNA. La pastilla resultante se lavó con 2 ml de etanol al 70%. Para retirar el etanol (JT Baker®), la pastilla se centrifugó a 10,000 xg/ 5 minutos y se decantó. Se agregaron 100 µl de buffer TE para disolver el material y se almacenó durante 2 días a 4°C para disolver el DNA.

Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica se empleó como ensayo preliminar para la evaluación de los iniciadores para el gen 16SrRNA. Se realizó PCR de punto final con iniciadores para el gen 16SrRNA: Lepto-F1 (5'AAATTGCCCGCAAGGGTA3') y Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGACTTG 3') en una mezcla con un volumen final de 25 µl (2.5 µl de buffer, 5 µl de MgCl, dNTP's 1 µl , 0.5 µl Taq polimerasa, 9 µl de agua libre de DNAsas y 5 µl de templado. Las condiciones del termociclador (ThermoFisher Scientific®) se conformaron por una desnaturalización inicial a 94°C/5 minutos; desnaturalización 94°C/ 30 segundos; y 40 ciclos de hibridación a 65°C/ 40 segundos; elongación 72°C/ 50 segundos, una elongación final a 72°C/ 7 minutos.

El producto de la PCR se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma®) a una concentración de 5µg/ml.

Extracción de RNA

Extracción de RNA con Trizol®

Se emplearon cultivos de 14 días de incubación de las cepas de *Leptospira* LOVE30, LOCaS46 y MOCA45. Previamente, los cultivos fueron observados utilizando microscopio de campo oscuro para descartar contaminación.

Se transfirieron 500 µl de cultivo puro con 14 días de incubación a un tubo de 1.5 ml estéril, se agregó un volumen de 500 µl de PBS 1X y 1 ml de Trizol (Invitrogen®) y se homogenizó vigorosamente durante 30 segundos. Se incubó a 65 °C durante 15 minutos y cada tres minutos se homogenizó en agitador electrónico (VELP Scientific®) durante 15 segundos. La separación de fases se

realizó adicionando 200 µl de cloroformo (JT Baker) y homogenizando durante 15 segundos. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 11,600 x g' por 15 minutos a 4°C. Una vez separadas, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml. Para precipitar el RNA se añadieron 500 µl de isopropanol (J.T. Baker®) y se homogenizó delicadamente por inversión del tubo; se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalizada la incubación, se centrifugó a 11,600 x g' por 10 minutos a 4°C. En esta etapa se visualizó una pastilla pequeña, la cual fue lavada con 750 µl de etanol al 75% frío, se centrifugó a 11,600 x g' por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. El RNA se solubilizó con 50 µl de agua destilada estéril más dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 % para eliminar las RNAsas, se calentó a 60°C por 5 minutos y se enfrió en hielo por 10 minutos. Posteriormente, se realizó la visualización del material extraído en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Sigma).

Extracción de RNA utilizando el producto comercial High Pure RNA Tissue Kit. (Roche®)

A un volumen de 500 µL de cultivo puro de *Leptospira* con 14 días de incubación se adicionaron 400 µl de Buffer de lisis, se homogenizó durante 30 segundos en agitador electrónico y se centrifugó a 13,000 x g' por 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se colectó en un tubo de 1.5 ml nuevo, libre de RNAsas. Se añadieron 200 µl de etanol absoluto (J.T. Baker®) y se homogenizó en un agitador electrónico durante 20 segundos. Se transfirió la mezcla a una columna de 2ml con tubo colector utilizando una pipeta con filtro. Nuevamente, se centrifugó a 13,000 xg/30 segundos/4°C. El líquido residual del tubo colector se descartó. En la

columna se colocaron 90 µL de buffer de incubación y 15 µl de DNAsa al 10%, se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Al finalizar la incubación se agregaron 500 µl de buffer de lavado I y se centrifugó a 8,000 xg/15 segundos/4°C. Se descartó el líquido residual del tubo colector. Se añadieron 500 µl de buffer de lavado II, se centrifugó a 8,000 xg/15 segundos/ 4°C y el líquido del tubo colector se descartó. Nuevamente, se añadieron 300 µl de buffer de lavado II a la columna y se centrifugó a 13,000 xg/ 2 minutos/4°C. Se centrifugó nuevamente a 13,000 xg/2 minutos/ 4°C. Se removió la columna cuidadosamente, procurando que no tocar los residuos del tubo colector, se colocó en un tubo de 1.5 ml nuevo libre de RNAsa. Se agregaron 60 µl de buffer de elución en el centro de la columna. Finalmente, se centrifugó 8,000 xg/1 minuto/ 4°C. La visualización de la extracción se llevó a cabo utilizando 2µl de la suspensión en geles de agarosa al 1.6 % teñidos con bromuro de etidio al 0.1%.

Extracción de RNA utilizando el producto comercial RNeasy Mini Kit 250 (QIAGEN®) y el equipo automatizado QIAcube (QIAGEN®)

En un tubo de 1.5 ml se colocó una perla de acero inoxidable de 5 mm de diámetro (TissueLyser, QIAGEN®) esterilizada con luz UV, se agregaron 350 µl de buffer RLT (sal de guanidina) previamente reconstituido con β-mercaptoetanol (β-ME) empleando 10 µl de β-ME (Sigma-Aldrich®) por 1 ml de buffer. Se añadieron 10 µl de proteinasa K (QIAGEN®) y 200 µl de cultivo de *Leptospira* con 14 días de incubación. Se homogenizó vigorosamente por 5 minutos en agitador electrónico (QIAGEN®) para generar la lisis de las espiroquetas. Posteriormente, se añadieron 250 µl de etanol absoluto (J.T. Baker®) en un tubo nuevo libre de RNAsas (proporcionado por el fabricante), al cual se transfirieron 700 µl de la

suspensión bacteriana lisada. El tubo se colocó en la cubeta plástica junto con una de las columnas con membrana de sílice (Figuras 3 y 4).

El tubo con el lisado bacteriano se colocó en la plataforma indicada en el equipo. Una columna fue colocada en el “rotor adapter” (consumible para desecho en el rotor de la centrifuga) para recibir la muestra proveniente del lisado térmico del equipo, cada lisado se transfirió a una columna. El material genético se unió a la membrana de sílice de la columna de centrifugación QIAGEN y se lavó para eliminar contaminantes. La columna se transfirió a un tubo para la elución del RNA. (Figuras 5 y 6). La extracción realizada con el equipo automatizado se comprobó con un ensayo posterior de RT-qPCR

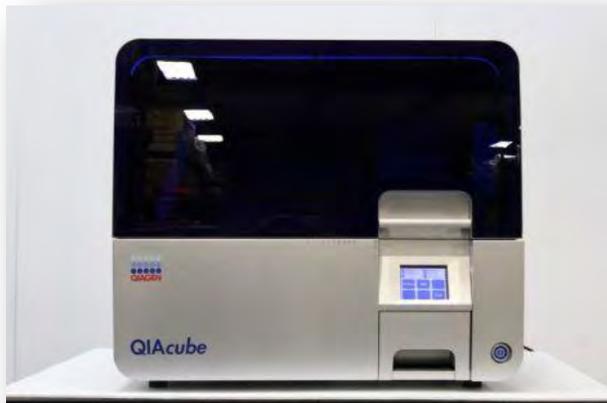


Figura 3. Dispositivo QIAcubeHT, equipo automatizado para extracción de material genético.



Figura 4. Cubeta plástica, tubo libre de RNAsas y columna con membrana de sílice



Figura 5. Colocación de las muestras en el adaptador (Rotor adapter) en la centrífuga.



Figura 6 Distribución al interior del equipo QIAcubHT.

Evaluación de la supervivencia de *Leptospira* en el agua

Se realizó la recuperación de 3ml de suspensión bacteriana a partir de cultivos de 14 días. Previamente, los cultivos fueron observados en gota a través del microscopio de campo oscuro (Zeiss) para descartar contaminación y evaluar su concentración celular con la cámara Petrof-fHausser. El cultivo recuperado fue resuspendido en 9 ml de agua de grifo esterilizada por autoclave (1 ml de cultivo por tubo), a partir de los cuales se realizaron diluciones décuples, transfiriendo 1 ml de la solución inicial (7×10^7 leptospiras/ml) a 5 tubos con 9 ml de agua estéril/tubo (Cuadro 2).

Cuadro 2 Diluciones décuples de *Leptospira* en agua esterilizada en autoclave

Número de tubo	Dilución (Leptospiras/ml)	Volumen final (agua estéril)
1	10^6	9 ml
2	10^5	9 ml
3	10^4	9 ml
4	10^3	9 ml
5	10^2	9 ml

Las diferentes diluciones, dos de cada una, se incubaron de la siguiente forma: la primera a 20 °C y la segunda a 30°C durante 30 días.

Estimulación nutricional de *Leptospira* y medición de la expresión de precursores de RNA

Para la evaluación de la supervivencia en el agua, las leptospiras fueron recuperadas en diferentes momentos de incubación (3, 10, 15 y 30 días), mediante centrifugación a 11,600 x g' por 20 minutos a temperatura ambiente y por duplicado; el sobrenadante fue desechado y las pastillas obtenidas se suspendieron en tubos de la siguiente manera: una de ellas se colocó en tubos con un volumen de 10 ml de agua estéril, la otra se colocó en 1 ml del cultivo en 9 ml de medio EMJH. Se realizó la estimulación a 20 y 30°C durante diferentes tiempos: 3, 6 y 18 horas, Se colectaron 3 ml de cada muestra, como se observa en la figura 7, y se centrifugarón a 13,000 xg/20 min. Los botones se almacenaron a -80°C.

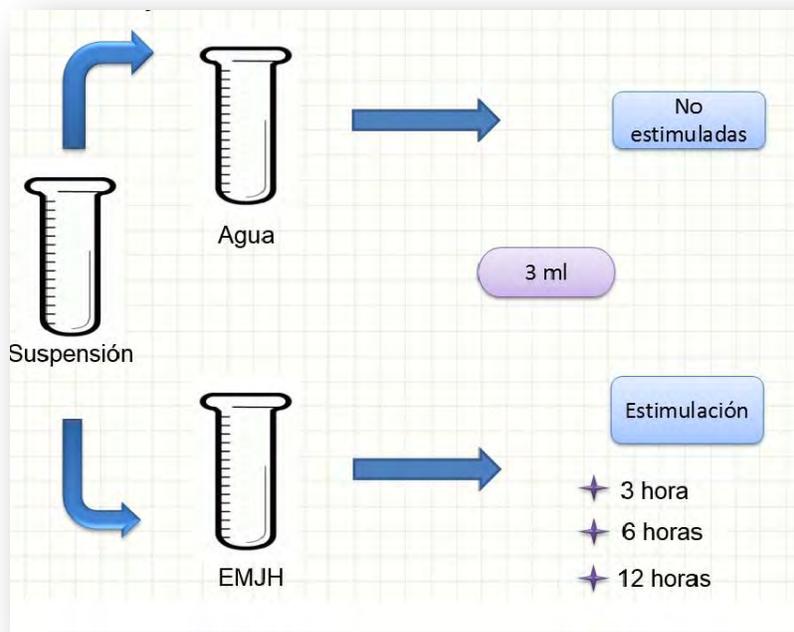


Figura 7. Tubo con suspensión bacteriana del cual se tomó 1 ml para estimularlo nutricionalmente en 9 ml de medio EMJH modificado. Se colocó 1 ml de suspensión en 9 ml de agua como control no estimulado.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Los iniciadores se validaron con el ensayo de PCR tiempo real (qPCR). Se empleó SYBR Green (Roche®) como generador de fluorescencia y se prepararon reacciones de 10 µl de volumen total (Cuadro 3). Para este ensayo se empleó el equipo LightCycler®.

Cuadro 3 Componentes para qPCR.

Reactivo	Volumen
Agua destilada grado molecular (Sigma®)	1.5 µl
iniciador Lepto-F1 (5'AAATTGCCCGCAAGGGTA 3')	0.5 µl
Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGACTTG 3')	0.5 µl
480 SYBR Green I Master	5 µl
Templado de RNA	2.5 µl
Volumen total	10 µl

Las condiciones que se emplearon para el ensayo fueron basadas en el protocolo para el diagnóstico de *Leptospira* patógena utilizado en el laboratorio de Patología Animal de Calamanda, Querétaro (Fearnley *et al.*, 2007). (Cuadro 4).

Cuadro 4 Condiciones para qPCR del gen 16srRNA de leptospiras patógenas.

Etapa	Condiciones
Desnaturalización Inicial	95°C/ 5 minutos
Desnaturalización	95°C/ 15 segundos
Hibridación	55°C/ 20 segundos
Elongación	72°/ 5 segundos
Enfriamiento	4°C/ 30 segundos
Número de ciclos	32 ciclos
Tasa de cambio de temperatura (Ramrate)	20°C por segundo

Se realizó un primer ensayo a partir del DNA total del cultivo de *Leptospira interrogans* Canicola cepa LOCaS46 con 14 días de incubación a 30°C en medio EMJH para determinar el número de ciclos para obtener la amplificación del control positivo.

Se prepararon diluciones de DNA de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, cepa LOCaS46 para determinar la concentración mínima de detección de material genético. Las diluciones empleadas fueron: 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1: 100, un control positivo de *Leptospira interrogans* y un control negativo de *E. coli*. Las diluciones se prepararon con agua grado molecular (Sigma).

RT-qPCR preliminar a partir de las diluciones obtenidas en el ensayo de estimulación nutricional

Se realizó extracción de RNA con el producto RNeasy Mini Kit 250 (QIAGEN®), a partir de las diluciones obtenidas por un ensayo de estimulación nutricional preliminar. El volumen de las reacciones fue de 10 µl, se utilizó el fluoróforo SYBR Green I Master y el kit miScript II RT Kit (QIAGEN®), las condiciones de las muestras para las reacciones se muestran en el cuadro 4. El ensayo se llevó a cabo en el equipo LightCycler (ROCHE®) del Laboratorio de Patología Animal. Se utilizó un cultivo de LOCAS 46 incubado a 20°C y a 30°C durante 3 días en agua de grifo esterilizada en autoclave (121°C/ 15 minutos/ 103 pKa) y con una hora de estimulación nutricional en medio EMJH. El experimento se realizó por triplicado. (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. muestras para el ensayo preliminar de qPCR.

Número de muestra	Concentración De Leptospiras	Temperatura de incubación
1	10 ⁶	30°C
2	10 ⁴	30°C
3	10 ²	30°C
4	10 ⁶	20°C
5	10 ⁴	20°C
6	10 ²	20°C

Cuadro 6. Componentes para la reacción de RT-qPCR a partir de RNA de *Leptospira*

Reactivo	Volumen
Agua destilada grado molecular	0.5 µl
iniciador Lepto-F1 (5' AAATTGCCCGCAAGGGTA 3')	0.5 µl
Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGACTTG 3')	0.5 µl
480 SYBR Green I Master	5 µl
RT	1 µl
Templado de RNA	2.5 µl
Volumen total	10 µl

Ensayo de cuantificación de pre-RNA para la evaluación de la supervivencia de *Leptospira*.

Con base a las observaciones realizadas en los experimentos anteriores, la selección de las muestras se basó en las siguientes características: días de incubación, temperatura de incubación, tiempo de estimulación nutricional y concentración celular, además de presentar fluorescencia a partir del ciclo 18.

Se realizó la extracción de RNA utilizando el producto comercial RNeasy Mini Kit 250 (QIAGEN) y el equipo automatizado QIAcube (QIAGEN) como ha sido descrito anteriormente.

De las extracciones almacenadas a -80°C se realizó la cuantificación del RNA total utilizando el equipo NanodropLite (Thermo Fisher). Antes de la medición, se limpió la superficie del lector con etanol al 70% y papel de seda, se empleó un blanco de agua libre de RNasa en donde el material genético fue suspendido. La limpieza

con etanol se realizó entre cada medición para evitar la alteración de los resultados.

Una vez realizada la extracción y cuantificación de RNA de las cepas LOCaS46, LOVE30 y MOCA45 incubadas durante 14 días en medio EMJH, se procedió a la técnica de RT-qPCR en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN®). Se prepararon diluciones décuples para realizar las curvas de calibración, partiendo de una concentración de RNA de 2.6 ng/μl. Se prepararon las diluciones: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1: 10,000. Cada reacción se procesó por triplicado a un volumen de 10 μl. Se realizaron ajustes en las condiciones del experimento que se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones del ensayo de RT-qPCR en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN®).

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre incubación	Desnaturalización inicial	37°C	60 minutos	1
	Linearización	95°C	5 minutos	
	Transcripción	55°C	30 segundos	
Amplificación PCR	Desnaturalización	95°C	15 segundos	31
	Hibridación	55°C	20 segundos	
	Elongación	72°C	5 segundos	
Curvas Melting	Hibridación	95°C	-----	1
Enfriamiento	Extensión final	10°C	30 segundos	1

Una vez estandarizado la concentración de reactivos y rango dinámico se procedió a utilizar las muestras problema para realizar la cuantificación absoluta utilizando el kit miScript II RT Kit y las condiciones arriba mencionadas.

Las muestras problema se normalizaron a una concentración de RNA de 2.8 ng/μl. Las reacciones se aforaron con agua MØ a 20 μl. Las muestras de referencia para las curvas de calibración se procesaron en reacciones de 20 μl con una concentración de RNA de 2.8 ng/μl. Las reacciones para las curvas de calibración se trabajaron por triplicado. Cuadro 8. El ensayo se llevó a cabo en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN®) con las condiciones descritas anteriormente.

Cuadro 8 Preparación de las reacciones de RT-qPCR para *Leptospira*. Las muestras se estandarizaron a una concentración de 2.8 ng/μl por reacción, en reacciones de 20 μl

Reacción	Reactivo	Volumen
qPCR	Iniciador Lepto-F1 (5'AAATTGCCCGCAAGGGTA 3')	0.5 μl
	Iniciador Lepto-R1 (5' TTGCTACTCCGCTTGA CTTG 3')	0.5 μl
	480 SYBR Green I Master	5 μl
RT	Buffer RT	1 μl
	dNTP's	1 μl
	H ₂ O MØ	0.5 μl
	miScript II RT	1 μl
RNA	H ₂ O MØ	Ajustado a 20 μl/ reacción
	Templado de RNA	Ajustado a 2.8 ng/μl
	Volumen total	20 μl

IV. Resultados

Determinación de la concentración bacteriana

La concentración bacteriana determinada mediante cuantificaciones con la cámara de Petroff-Hausser (HAUSSER SCIENTIFIC®) se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Concentración de leptospiras por mililitro en cultivo puro de las cepas de trabajo LOCaS46, LOVE30 y MOCA45 con 14 días de incubación a 30°C en medio EMJH modificado

Cepa	Concentración bacteriana
LOCaS46	6.7×10^7
MOCA45	6.8×10^7
LOVE30	7.2×10^7

Diseño y validación de los iniciadores

El diseño de iniciadores para el gen 16srRNA se realizó tomando en cuenta las características consideradas como ideales para su diseño, tales como una longitud del 18 a 24 bases, valores de temperatura de fusión (T_m) entre 55-65 °C con variaciones de 2-3°C entre los iniciadores complementarios, evitar secuencias con tendencia a la formación de estructuras secundarias e incluir GC en el extremo 3' (Giorgio, 2015). (Cuadro 10).

Cuadro 10 Características de los iniciadores para detección del gen 16s rRNA de leptospiras patógenas.

Característica	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
Secuencia	5'AAATTGCCCGCAAGGGTA 3'	5'TTG CTA CTC CGC TTG ACT TG 3'
Longitud	18	20
Tm	62.2 °C	62.3 °C
Contenido de GC	50 %	50%

La visualización de los productos de PCR de los iniciadores se realizó en geles de agarosa al 1%. Figura 8.

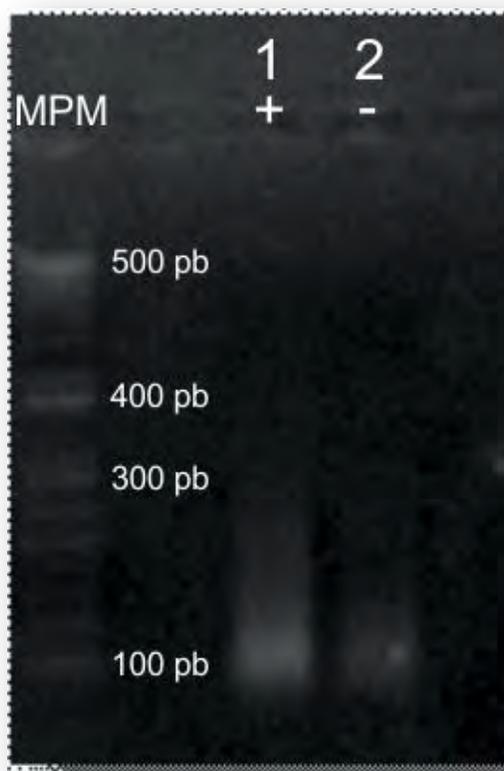


Figura 8 Visualización de los productos de PCR del gen 16SrRNA, leptospiras patógenas, (cepa LOCaS46 (en el carril 1) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El tamaño del producto amplificado corresponde a 100 pb

Extracción de RNA

Se probaron 3 métodos para la extracción de RNA, con la finalidad de encontrar una técnica rápida que permita obtener una adecuada cantidad de material genético con buena calidad y a menor costo. Se optó por el uso del sistema automatizado y el uso del producto RNeasy Mini Kit 250 (QIAGEN®). (Figura 9)

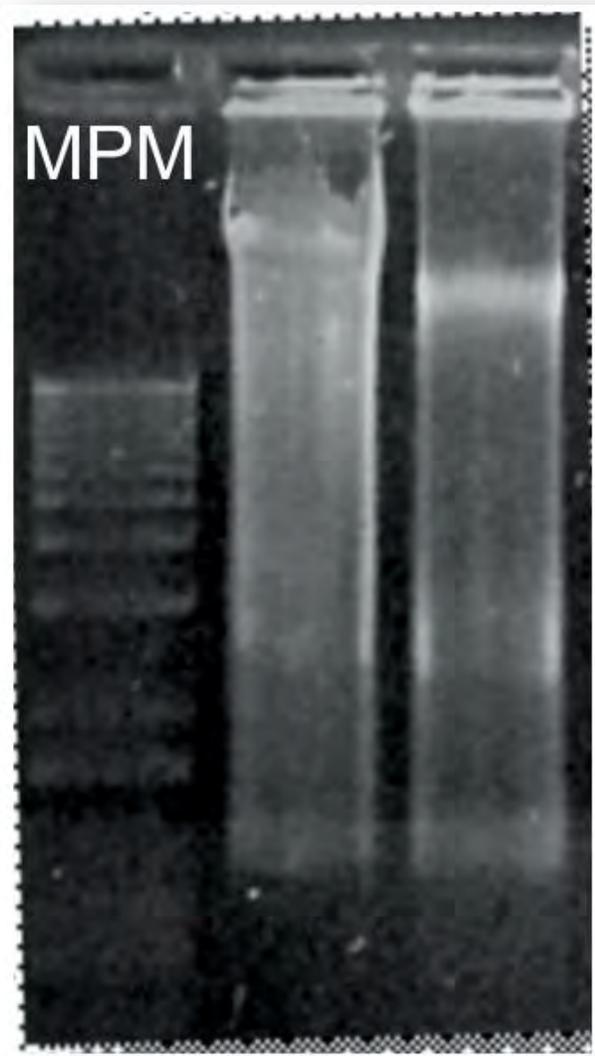


Figura 9. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, en donde se observan tres bandas que corresponden a RNA completo de *Leptospira*.

Evaluación de la supervivencia de *Leptospira* en el agua

Se obtuvieron un total de 216 muestras que incluyen las tres cepas de *Leptospira*: LOCaS46, LOVe30 y MOCA45, en tres concentraciones diferentes (10^6 , 10^5 , 10^4), en cuatro ensayos de estimulación nutricional (3, 10, 15 y 30 días), en tres tiempos de muestreo (3, 6 y 18 horas) y a dos temperaturas (20 y 30°C).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

En el primer experimento se probó DNA total de un cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 con 14 días de incubación a 30 °C en medio EMJH. (Figura 10).

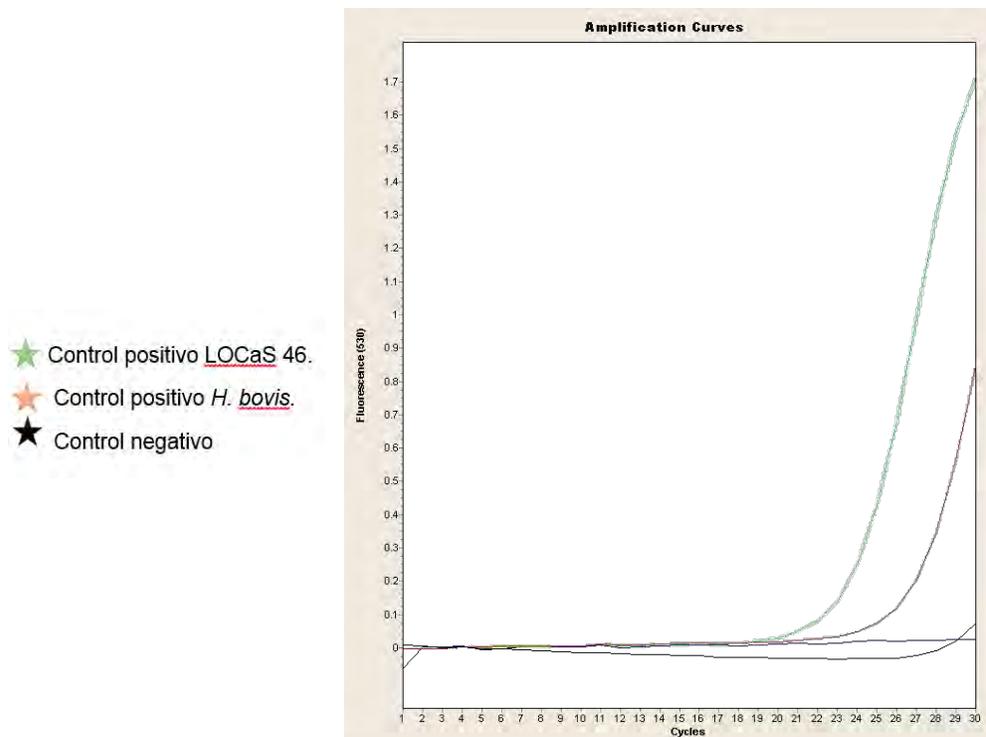


Figura 10. Curvas de amplificación de qPCR. Se observa que el control positivo correspondiente a *Leptospira canicola* cepa LOCaS46 amplifica en el ciclo 23 mientras que el control positivo correspondiente a *Hardjobovis* mostró amplificación en el ciclo 24, en contraste con el control negativo que no mostró amplificación.

qPCR a partir de diluciones de DNA de *Leptospira canicola* cepa LOCaS46

La concentración mínima de detección de material genético se realizó a partir de una dilución 1:50 de DNA de *Leptospira*. (Figura 11)

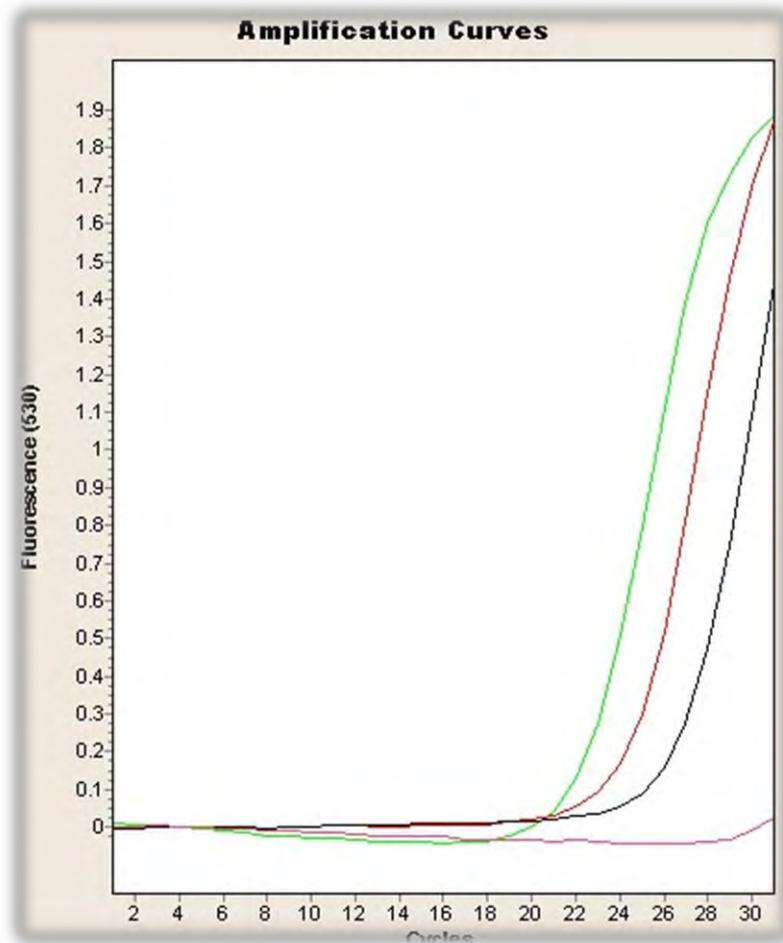


Figura 11 Curvas de amplificación de qPCR de *Leptospira canicola* cepa LOCaS46. Se observa amplificación de la concentración 1:5 en el ciclo 22, de la concentración 1:25 en el ciclo 24 y de la concentración 1:50 en el ciclo 26.

qPCR preliminar a partir de las diluciones obtenidas en el ensayo de estimulación nutricional.

Se determinó que las muestras de la serovariedad Canicola de la cepa LOCaS46 con una concentración de 10^6 y 10^5 mostraron amplificaciones similares al control positivo Hardjo bovis. Las muestras que fueron incubadas a 30°C durante 14 días amplificaron en el ciclo 16, mientras que las incubadas a 20°C lo hicieron en el ciclo 20. (Figura 12)

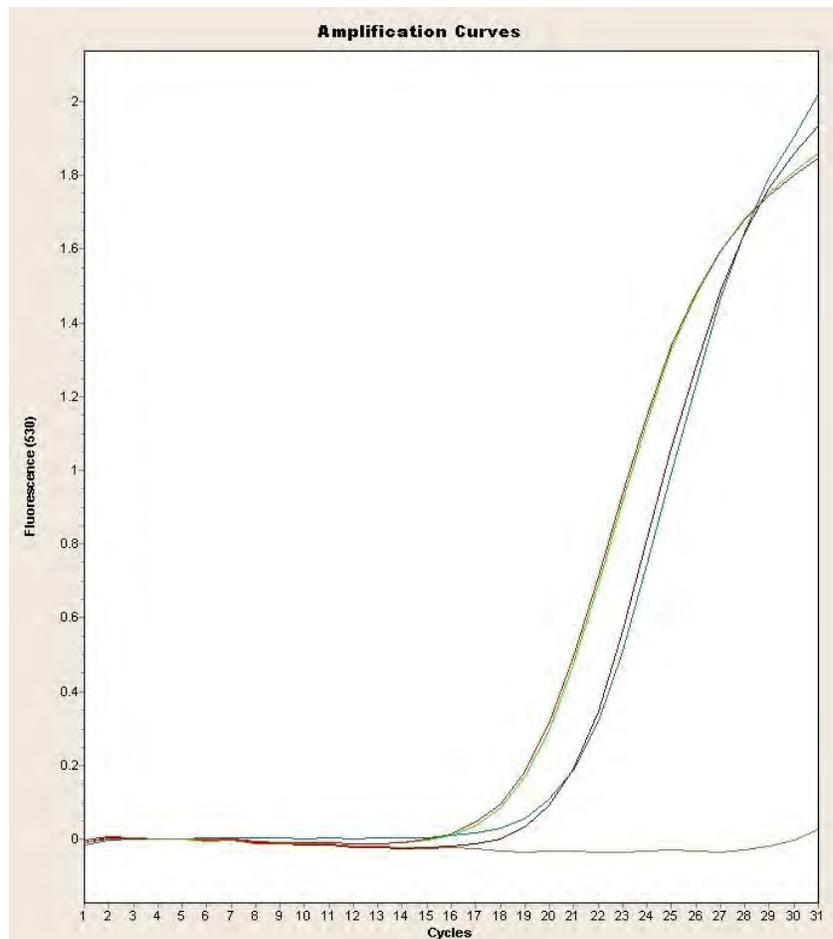


Figura 12. qPCR a partir de DNA de Leptospira cepa LOCaS46. Se observan las muestras incubadas a 30°C amplificando 4 ciclos antes que las de 20°C , lo que coincide con mayor apreciación de material genético

Selección de las muestras problemas

De acuerdo con los resultados de los experimentos anteriores, se seleccionaron las muestras de *Leptospira* cepas LOCaS46, LOVE30 y MOCA45 con las concentraciones 7×10^6 y 7×10^5 , de los días 1 y 30, con 3 horas de estimulación nutricional de ambas temperaturas, siendo un total de 48 muestras. (Cuadro 11)

Cuadro 11 Criterios para la selección de muestras para evaluar la supervivencia de *Leptospira* en agua mediante la detección de precursores de rRNA (Pre-RNA) mediante RT-qPCR.

Días de incubación en agua	1 y 30
Temperatura de incubación	20°C y 30°C
Tiempo de estimulación nutricional	3 horas
Concentración celular	7×10^6 y 7×10^5

Extracción de RNA de *Leptospira* y cuantificación del material genético.

La extracción de RNA se llevó a cabo con el equipo automatizado QIAcubeHT (QIAGEN®) y se obtuvo una suspensión de material genético en un volumen de 30 μ l. La concentración obtenida en la cuantificación de RNA de las cepas LOCaS46, LOVE30 y MOCA45 fue de 2.8 ng/ μ l. En las muestras problema, se obtuvo una concentración máxima de 3.9 ng/ μ l, y una concentración mínima de 0.7 ng/ μ l. A partir de estos resultados, las reacciones para RT-qPCR se estandarizaron a una concentración de 2.8 ng/ μ l.

Curvas de calibración

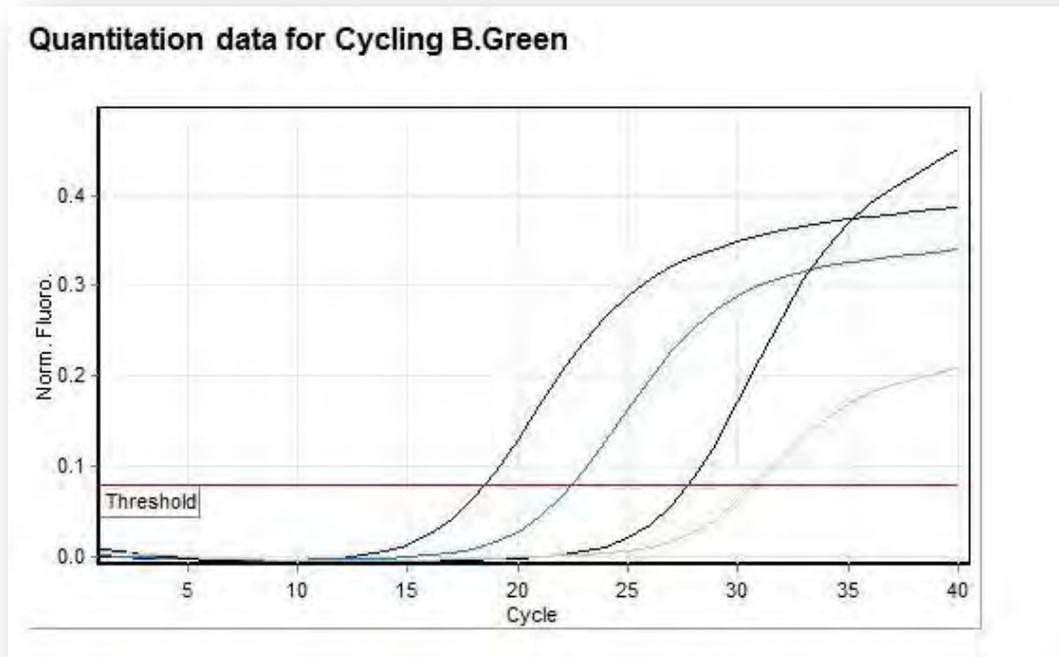


Figura 13. Resultados de la curva de calibración por RT-qPCR a partir cDNA del RNA extraído de la cepa LOCaS46 con el gen 16sRNA. El rango dinámico se obtuvo en los ciclos recomendados y con buena distribución entre cada una de las diluciones.

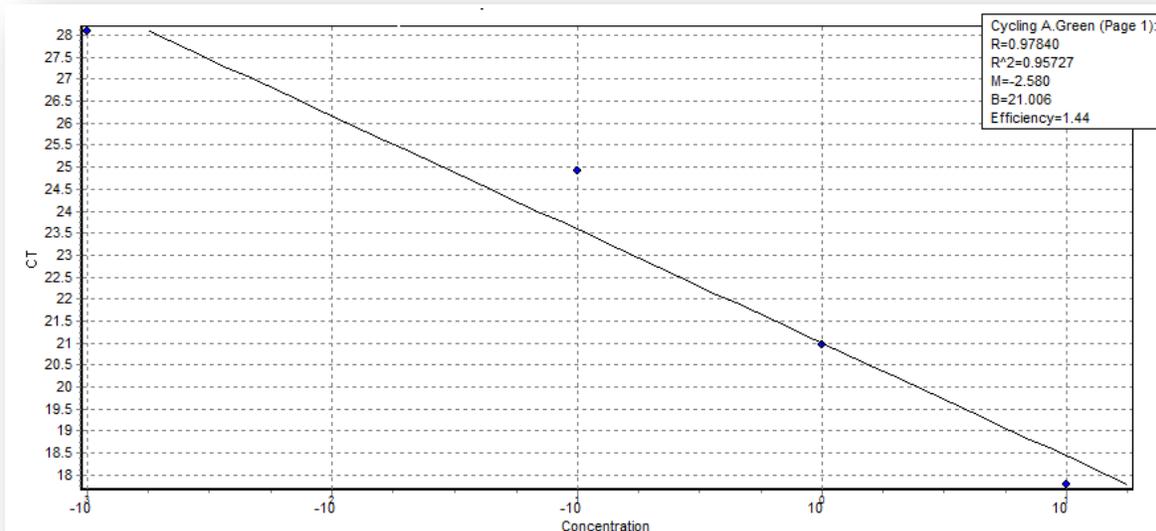


Figura 15 Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen 16srRNA de leptospiras patógenas. La eficiencia obtenida fue de 0.95 y el valor de la pendiente de -2.5.

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR).

El aumento de precursores de rRNA (pre-rRNA) de *Leptospira* se observó a las 3 horas de estimulación nutricional. Se demostró que las muestras con concentración de 7×10^6 incubadas a 30°C amplificaron de manera evidente, mientras que las muestras con concentración de 7×10^5 a 30°C , mostraron amplificaciones con valores fuera de las curvas de calibración. En el caso de las muestras incubadas a 20°C de ambas concentraciones no mostraron amplificación, por lo tanto, no tuvieron un aumento de la cantidad de pre-rRNA después de la estimulación nutricional. De igual forma, las muestras sin estimulación nutricional tampoco mostraron amplificaciones durante el ensayo. (Cuadro 12)

Cuadro 12 Cuantificación del número de copias del gen 16srRNA de *Leptospira* de las cepas LOCaS46, LOVE30 y MOCA45, de muestras con 1 y 30 días de incubación en agua a una concentración de 7×10^6 , con tres horas de estimulación nutricional.

Muestra	N. de copias	Reproducibilidad (R^2)	Pendiente (M)	Eficiencia (E)	Umbral de detección
LOCaS46 día 1	0.747	1	-3.3	98%	0.0891
LOCaS46Día 30	0.845	1	-3.3	98%	0.0891
LOVe30 día 1	1.017	1	-3.3	98%	0.0891
LOVe30 día 30	2.349	1	-3.3	98%	0.0891
MOCA45 día 1	2.184	1	-3.3	98%	0.0891
MOCA45 día 30	4.345	1	-3.3	98%	0.0891

V. Discusión

El agua puede convertirse fácilmente en una fuente de infección para enfermedades parasitarias, virales y bacterianas (algunos ejemplos incluye la taeniasis, hepatitis B, leptospirosis). (OMS, 2018).

En el caso de la leptospirosis, el agua es un factor de riesgo determinante para el mantenimiento de la enfermedad en áreas endémicas. El clima, los factores ambientales, la falta de saneamiento, y la presencia de agentes enzoóticos crean las condiciones ideales para la presentación de la leptospirosis en los países en desarrollo (Bharti *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004), donde la incidencia ha ido en aumento en los últimos años (Vijayachari *et al.*, 2008).

La persistencia a largo plazo de especies patógenas de *Leptospira* en agua dulce y suelos se ha documentado ampliamente, tanto en condiciones de laboratorio como en entornos naturales (Smith and Self, 1955; Smith and Turner, 1961; Baker and Baker, 1970; Karaseva *et al.*, 1973; Alexander *et al.*, 1975; Hellstrom and Marshall, 1978; Faine *et al.*, 1999; Khairani-Bejo *et al.*, 2004; Cameron *et al.*, 2008). Las condiciones ambientales que favorecen la supervivencia de *Leptospira* en el entorno incluyen la humedad persistente, una baja exposición a la radiación UV, pH ligeramente alcalino, temperaturas cálidas, y la presencia de oxígeno (Faine *et al.*, 1999). En estudios previos, se ha demostrado supervivencia de cepas patógenas por cortos periodos en agua salada (Khairani-Bejo *et al.*, 2004; Trueba *et al.*, 2004). Sin embargo, Los mecanismos por los cuales *Leptospira* sobrevive en el ambiente siguen siendo desconocidos, en parte debido a las limitaciones en las metodologías disponibles para evaluar viabilidad, por lo que la

importancia de la persistencia en el ambiente dentro de la dinámica de transmisión de la leptospirosis ha sido difícil de establecer.

En 2015, Andre-Fontaine y colaboradores mostraron que una depa de la serovariedad Icterohaemorrhagiae pudo ser reaislada después de veinte meses de conservación en agua de fuentes naturales, con una media de supervivencia de 130 días a 4°C, 263 días a 20°C y 316 días a 30°C. La media de supervivencia fue mayor a un pH menor a 7 (344 días), preservando su virulencia hasta por lo menos veinte meses. (Fountainne *et al.*, 2015).

Dada la necesidad de desarrollar una metodología rápida y beneficiosa para la detección e identificación de bacterias patógenas en muestras clínicas o ambientales, que ayuden en el conocimiento de la epidemiología, el diagnóstico y tratamiento de la leptospirosis, se han probado herramientas moleculares que incluyen métodos analíticos basados en la detección de ácidos nucleicos, los cuales han contribuido para conocer la diversidad microbiológica en muestras ambientales. Sin embargo, estos métodos proporcionan información limitada sobre el estado fisiológico de las bacterias, principalmente la viabilidad. Podemos afirmar que un microorganismo inviable es aquél que pierde la capacidad para replicarse. Una definición amplia de viabilidad podría extenderse a aquellas bacterias que conservan la homeostasis y su actividad metabólica, incluso si ya no pueden replicarse a corto plazo en condiciones específicas. Tales microorganismos se clasifican como “viables, pero no cultivables”. (Byrd *et al.*, 1991; Nyström, 2001; Cangelosi and Meschke, 2014) El propósito de este trabajo fue examinar la prueba de viabilidad bacteriana de detección de precursores de RNA (Pre-rRNA).

Las estrategias de detección de viabilidad bacteriana llamadas "pruebas de viabilidad molecular", correlacionan la viabilidad con la capacidad de sintetizar rápidamente una macromolécula (un precursor de rRNA específico de la especie, o pre-rRNA), en respuesta a un breve estímulo nutricional. La síntesis pre-rRNA sobre la estimulación nutricional se detecta por qPCR de transcriptasa reversa (RT-qPCR). (Cangelosi *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2014; Weigel *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo las pruebas de viabilidad molecular, se requiere de una cuidadosa metodología para la extracción del material genético, como por ejemplo el equipo automatizado QIAcubeHT (QIAGEN®). En estudios anteriores, los equipos automatizados han demostrado ser confiables, rápidos y prácticos (Alp and Hasçelik, 2014). El método automatizado de extracción de RNA empleado en este trabajo cuenta con funciones de seguridad que incluyen una cubierta traslúcida que protege las muestras de la contaminación, un filtro HEPA que mantiene el aire libre de microorganismos al ejercer presión positiva sobre la superficie de trabajo, y la luz UV, que proporciona una descontaminación eficiente de la superficie y ayuda a prevenir la contaminación cruzada. El procesamiento automatizado demostró ser preciso y repetible en diferentes concentraciones de RNA de *Leptospira*. El sistema de extracción con columnas de sílice permitió la extracción de RNA sin riesgo de contaminantes inhibidores que pudieran afectar la calidad del material genético, lo que se pudo comprobar con la posterior cuantificación de RNA y la realización de la RT-qPCR. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), se utilizó para cuantificar los pre-rRNA específicos en una alícuota estimulada con medio EMJH en relación con un

control no estimulado, además de excluir la señal de fondo de bacterias no viables y de ADN libre, lo que aumentó la sensibilidad analítica de RT-qPCR para detectar viabilidad.

Las pruebas de viabilidad molecular (MVT) se emplean para detectar específicamente bacterias viables en muestras complejas (Cangelosi *et al.*, 2010).

La breve estimulación nutricional induce a las bacterias viables, pero no a las bacterias no viables, a producir cantidades abundantes de precursores de ARN ribosómicos específicos de la especie (pre-rRNA) (Cangelosi *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2014). En este trabajo las muestras se dividieron en dos alícuotas, una de las cuales fue estimulada nutricionalmente al añadirle medio de cultivo EMJH modificado. Los niveles de pre-rRNA aumentaron luego de la estimulación, en contraste a no estimuladas, mostrando la presencia de bacterias viables en la muestra. La estimulación es rápida, se ha reportado que con dos horas de exposición a los nutrientes es suficiente para registrar un cambio ascendente en la cantidad de copias de pre-rRNA en microorganismos como *Aeromonas*, y de 4 a 6 horas en bacterias de crecimiento lento como *M. tuberculosis* (Cangelosi *et al.*, 2010). La detección para los controles no estimulados mediante la RT-qPCR en los diferentes tratamientos: las temperaturas (20 °C y 30 °C) y las concentraciones (7.5×10^5 y 7.5×10^6), pueden indicar que el metabolismo de las leptospiras permaneció inactivo al ser incubadas en agua y no recibir estimulación nutricional.

Se ha observado que la detección de precursores de RNA es hasta 10 veces más sensible que una qPCR estándar dirigida a la detección de DNA de diversos patógenos bacterianos (*Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria*

monocytogenes, *Mycobacterium avium* y *Staphylococcus aureus*) en suero, leche y agua del grifo (Do *et al.*, 2014). La mejora de la sensibilidad es debida al elevado número de copias de pre-ARNr en relación con el ADN genómico y también la reducción de señales de fluorescencia débil.

En trabajos anteriores, se ha demostrado que la síntesis de proteínas y el contenido de RNA se correlacionan tanto en bacterias de desarrollo más rápido, como *Escherichia coli*, como en bacterias de desarrollo lento, como *Mycobacterium bovis* BCG (Davey, 2011; Cangelosi *et al.*, 2010; Weigel *et al.*, 2013; Do *et al.*, 2014).

La RT-qPCR demostró ser una valiosa herramienta para identificar leptospiras patógenas viables en muestras de agua inoculadas experimentalmente. En trabajos futuros se podría utilizar esta metodología para evaluar muestras ambientales complejas y determinar la contaminación del agua de una zona geográfica y la presencia de organismos viables, el riesgo relacionado con actividades que implican la inmersión por tiempo prolongado y la epidemiología en la transmisión de la leptospirosis en el medio ambiente.

VI. Referencias

1. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009; 32:463-476.
2. Baker MF, Baker HJ. Pathogenic *Leptospira* in Malaysian surface waters. I. A method of survey for *Leptospira* in natural waters and soils. *Am J Trop Med Hyg*. 1970; 19:485-92.
3. Barragán VA, Mejía ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Curr Microbiol*. 2011; 62:1802-1806.
4. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:757-771.
5. Bulach, D.M, Zuerner, RL, Wilson, P, Seemann, T, McGrath, A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch, B, Coppel, RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103:14560–14565.
6. Bustamante, M. E.: *Gac. Med. Mex*. 1932, 67:10.

7. Byrd JJ, Xu HS, Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol* 1991; 57:875–878.
8. Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, Colegrove KM, Norman SA, Lambourn DM, Jeffries SJ, Gulland FM. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:1728-1733.
9. Cangelosi GA, Meschke JS. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80:5884-5891.
10. Cangelosi GA, Weigel KM, Lefthand-Begay C, Meschke JS. Molecular detection of viable bacterial pathogens in water by ratiometric pre-rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:960-2.
11. Carmona GC, León LL, Castillo S, Ramírez O, Ko A, Luna P, De la Peña M. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. *Veterinaria México* 2011; 42.
12. Carrada FG, Calderón VE, Martínez HC. Leptospirosis: pleomorfismo clínico en el síndrome febril. *Rev Salud en Tabasco* 2002; 8:128- 132.
13. Castillo CPA. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina. Instituto de Salud Pública Bogotá, Colombia 2014

14. Colín O, Pérez SJ, Caballero SA, García RJ, Ibarra LL, Cuellar EJ. Seroprevalencia a leptospiras en un grupo de riesgo de Guadalajara, Jalisco. *Enf Infecc Microbiol* 2004; 24:134-137.
15. Davey HM. Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:5571–5576.
16. Do J, Weigel KM, Meschke JS, Cangelosi GA. Biosynthetic enhancement of the detection of bacteria by the polymerase chain reaction. *PLoS One* 2014; 9:1-7.
17. Dorantes AL. Estudio retrospectivo de leptospirosis en el centro de recría de becerras de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo de enero 1977 a diciembre de 1983 (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1985.
18. Du M, Chen J, Zhang X, Li A, Li Y, Wang Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate”, *App Environt Microbiol*. 2007; 73: 1349- 1354.
19. Ellinghausen HC. Jr, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and médium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res*. 1965; 26: 45-51.
20. Ellinghausen HC. Virulence, nutrition and antigenicity of *Leptospira interrogans* serotype Pomona in supplemented and nutrient deleted bovine albumin medium. *Ann Microbiol* 1973; 124:477-493.

21. Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: The present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers. Brussels (Luxembourg). 1986: 13-24.
22. Ellis WE. Clinical leptospirosis in animals. En memorias del: Segundo Taller Internacional y Segunda Reunión Científica. Leptospirosis, Habana 2004; 2004; 17-28.
23. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci, Melbourne 1999.
24. Fearnley C, Wakeley P, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaude C, Woodward M. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue viable but nonculturable bacteria in drinking water. Appl. Environ. Microbiol 1991; 57:875–878.
25. Fontaine A, Aviat F, Thorin C. Waterborne leptospirosis: survival and preservation of the virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water.
26. Ganoza C, Michael A, Collins-Richards D, Brouwer k, Calaveras B, Cunningham, Segura G, Gotuzzo E, Vinetz J. Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. Plosmedicine 2006; 3:1329-1340.
27. Gentilini F, Zanoni RG, Zambon E, Turba ME. A comparison of two real-time polymerase chain reaction assays using hybridization probes targeting either 16S ribosomal RNA or a subsurface lipoprotein gene for detecting leptospires in canine urine. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2015; 27: 696–703.

28. Giorgio E. Introducción al diseño de primers. Disponible en: <http://www.aulavirtualexactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWNjafNuLnBkZg==&cidReset=true&cidReq=BIOINFO>. Citado en 2018.
29. Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*. 2006. 8:1-16.
30. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:65-97.
31. Hartskeerl RA., Collares-Pereira M., Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17:494-501.
32. Hellstrom JS, Marshall RB. Survival of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in an acidic soil under simulated New Zealand field conditions. *Res Vet Sci*. 1978; 25:29-33.
33. Johnson MA, Smith H, Joeph P, Gilman RH, Bautista CT, Campos KJ, Cespedes M, Klatsky P, Vidal C, Terry H, Calderon MM, Coral C, Cabrera L, Parmar PS, Vinetz JM. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10:1016-1022.
34. Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA. Results of studying the time of survival of pathogenic *Leptospira* under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1973; 17:339-345.

35. Khairani-Bejo S, Bahaman AR, Zamri-Saad M, Mutalib AR. The survival of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the Malaysian environment. J An Vet Advances 2004; 3: 123-129.
36. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7:736–747.
37. Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Report of the First Meeting. World Health Organization. Geneva, 2010.
38. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14:296–326.
39. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver J.D, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front Microbiol. 2014; 5:1-20.
40. Mendoza Hernández, P.; Varela, G., y Méndez, D.: Rev. Inst. Salub. y Enj. Trop. (IMéxico) 1958, 18:37.
41. Menéndez M, Rebollo M, Núñez M, Cox R, García M. Analysis of the Precursor rRNA Fractions of Rapidly Growing Mycobacteria: Quantification by Methods That Include the Use of a Promoter (*rrnA* P1) as a Novel Standard. J Bacteriol 2005; 187: 534–543.
42. Mitsumasa S, Sharon Y, Villanueva AM, Chakraborty A, Satoshi M, Takaya S, Tatsuma A, Ryo O, Gloriani N, Yasutake Y, Yoshida S. Comparative Analysis of *Leptospira* Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. Applied and Environmental Microbiology 2013;79: 601–609.

43. Mitsumasa S, Villanueva S, Kawamura Y, Lida K, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Kazunobu A, Gloriani N, Yoshida S. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2013; 63: 2457–2462.
44. Moles y CLP, Hernández VJ, Gavaldón RD, Torres BJI, Rojas SN, Cadena LJG. Resultados preliminares del seroperfil de leptospirosis bovina realizado en el centro de cría en Tizayuca, Hidalgo. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría; 2004 agosto 12-14; Morelia (Michoacán) México. México (DF):Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos,
45. Morey RE, Galloway RL, Bragg SL et al. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 2006; 44:3510–3516.
46. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. J of Microbiol, Immunol and Infecti 2013; 46: 245-252.
47. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et. al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol. 2004, 186:2164–2172.
48. Noguchi H, Klieger J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Merida, Yucatan. J Exp Med 1920; 32:627-637.

49. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. Dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 67:310–320.
50. Nyström T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol.* 2001; 176:159–164.
51. Ochoa JE., Sánchez A., Ruíz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2000; 7:325-331.
52. Oerther DB, Pernthaler J, Schramm A, Amann R, Raskin L. Monitoring precursor 16S rRNAs of *Acinetobacter* spp. in activated sludge wastewater treatment systems. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:2154-2165.
53. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 2005; 43: 93-100.
54. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol R.* 2010; 34: 415- 425.
55. Organización Mundial de la Salud 2008. Disponible en http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&lang=es. Citado en 2017.
56. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades relacionadas con el agua. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/es/. Citado en 2018.

57. Pérez GP. Am. Jour. Med. Assn. 1923; 3:325.
58. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Médecine et Maladies Infectieuses 2013; 43:1–9.
59. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP y Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. Front in Microbiol. 2014; 2:1-20.
60. Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, Willingham AL, Verma A. Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on St. Kitts. Int J Environ Res Public Health 2014; 11:7953-7960.
61. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et. al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature 2003, 422; 888–893.
62. Saint Girons I, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, Hendrix RW, Glaser P, Charon N. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of and *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. J Bacteriol. 2000; 182: 5700–5705.
63. Sardesai Y N. Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. Current Science. 2005; 89: 1650-1651.
64. Shenberg E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. J Bacteriol. 1967; 93:1598-606.

65. Sikkema R, Abela-Ridder B, Hartskerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 1:5-7.
66. Smith CR, McGowan MR, McClintock CS, Corney BG, Ketterer PJ, Smythe L, Ward W. Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo infection of pregnant cattle. *Aust Vet J*. 1997; 75:822-826.
67. Smith DJ, Self HR. Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *J Hyg (Lond)*. 1955; 53:436-444.
68. Smith SE, Turner LH. The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull W H O*. 1961; 24:35-43.
69. Solano A, Boza R, Sáenz E. Leptospirosis en Humanos. *Rev Costarrica Cienc Med*. 1996; 17:41-60.
70. Stoddard R., Bui D., Haberling D., Wuthiekanun V., Thaipadungpanit J., Hoffmaster A. Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in Thailand in various water types, pH, and temperature conditions. *Trop. Med. Hyg*. 2014; 91:1020–1022.
71. Tamagnini LM, Paraje MG. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (Revisión bibliográfica). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2015; 2:99-102.
72. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol*. 2004; 7:35–40.

73. Varela, G, Vásquez, A, Mancera L. Rev. Inst. Salub. y Enj. Trop. México. 1958; 18:31.
74. Varela G, Zavala J. Estudio de leptospirosis en Yucatan. Rev Medicina. 1962; 42:488.
75. Velasco-Castrejón O, Rivas SB, Espinoza HJ, Martínez HE. Diagnosis of chronic leptospirosis, comparison between the microscopic agglutination and three confirmatory diagnostic techniques. Rev Cubana Med Trop 2007; 59: 8-13.
76. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J Biosci. 2008; 33:557-569.
77. Vinetz JM., Glass GE., Flexner CE., Muller P., Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med. 1996; 125:794-798.
78. Wagner S, Tassinari D, Pellegrini C, Renato B. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. Trop Med Int Health. 2008; 13:503-512.
79. Weigel KM, Jones KL, Do JS, Melton Witt J, Chung JH, Valcke C, Cangelosi GA. Molecular viability testing of bacterial pathogens from a complex human sample matrix. PLoS One. 2013; 8:1-8.
80. Weil A. Ueber einer eigenhuemliche, mit Milztumor, Icterus un Nephritis einhergehende, acute Infektioskrankheit. Deutsch Arch Klin Med. 1886; 39: 209.
81. Wendy M, Townsend J, Sheryl G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. Vet Ophthalmol. 2006; 3:169-173.

82. Wójcik-Fatla A, Zając V, Wasiński B, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. *Ann Agricultural Environ Med.* 2014; 21:730–732.
83. Wynwood SJ, Graham GC, Weier SL, Collet TA, McKay DB, Craig SB. Leptospirosis from water sources. *Pathog Glob Health.* 2014; 108:334-338.
84. Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol.* 2005.
85. Zunino EM, Pizarro PM. Leptospirosis. Puesta al día. *Rev Chil Infect.* 2007; 24: 220-226.
86. Zúñiga-Carrasco IR, Caro-Lozano J. Epidemiological overview of leptospirosis, United Mexican States 2000–2010. *Enf Inf Microbiol* 2013; 33: 71–76.

Abreviaturas y siglas usadas

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DEPC: dietilpirocarbonato.

GC: porcentaje de guanina y citosina.

ml: mililitros.

μl: microlitros.

ng: nanogramos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pKa: constante de disociación ácida.

Pre-rRNA: precursores de RNA ribosomal.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RNA: ácido ribonucleico.

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico.

RTq-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

SDS: Dodecil sulfonato de sodio.

T_m: temperatura de fusión.

X g': gravedades