



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

**Evaluación de *gspD* para la tipificación de aislados de  
*Leptospira* mediante la secuenciación de *Locus*  
Múltiples (MLST).**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A :**

**CARLOS ALFREDO CARMONA GASCA**

TUTOR:

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL:

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO

DR. FELICIANO MILIAN SUAZO

**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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

A mis padres José Luis Carmona Medina y Rosa María Gasca Sandoval y a mis hermanos Adriana, Jesús y José por su ayuda, apoyo y cariño.

A la señora Imelda Medina, aún después de tanto tiempo todavía te extraño .

Con mucho cariño a Olivia Castillo Sánchez por querer compartir tu vida a mi lado y a ese ser maravilloso, que aunque todavía no llega, llena nuestra vida de felicidad.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma y a todos mis compañeros del Grupo de Investigación en *Leptospira* y *Leptospirosis* (GrILLep): Armando, Alejandra, Rodrigo, José Manuel, Horacio, Tania, Rocio, Mario, Diana, Erika Margarita, Erika Odilia, Jorge Alejandro, Veronica y Elena y del Departamento de Microbiología e Inmunología: Dr. Alfredo Sahgún, Dr. Rigoberto Hernandez, Dr. Ricardo Moreno Chan, Dr. Daniel Atilano, Dra. Cristina Rodríguez, Dr. Gustavo García Delgado, Dr. Humberto Ramírez Mendoza y sus alumnos, Dra. Rosa Elena Miranda, Dra. Marcela Figueroa, Dr. Raymundo Iturbe, QFB. Elvia Lazo, QFB. Carolina Segundo, Sr Mario Cruz, Pablo Vera, Raul Mendoza, Karla Mollinedo, Karina, Veronica Rojas, Martha Juaréz y a todos aquellos que me brindaron ayuda y palabras de aliento.

A la Dr. Ma Teresa Quintero, Clara Aguillón.

A ellos y a todos quienes me enseñaron a vivir y no claudicar en los momentos difíciles, así como no desistir de mis ideas y proyectos. A la memoria de todos los animales cuya vida esta suspendida a la voluntad e irracionalidad del ser humano y sin embargo ofrecen un cúmulo de conocimientos soportando todo sin queja alguna.

Take the first step in faith. You don't have to see the whole staircase, just take the first step

Martin Luther King Jr.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ y a la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Costatación del Centro de Enseñanza e Investigación en Produccion Animal en Altiplano.

A mi tutor Alejandro de la Peña Moctezuma por la oportunidad de realizar este importante proyecto profesional, dirigir esta tesis, todos sus consejos y apoyo personal en todo momento.

A mis tutores de maestria y doctorado, a los doctores Mario Medina Cruz, Feliciano Millian Suazo y Edmundo Calva Mercado por su crítica y sus apreciables consejos al proyecto de investigación.

Al jurado para realizar el cambio de programa Dr. Francisco Suarez Güemes, Dra. Camilla Arriaga, Dr. José Juan Martinez Maya y Dr. Alejandra Ayanegui Alcérreca.

A los doctores Juan Joel Mosqueda Gualito, Victor Banda Ruiz, Rogelio Alonso Morales y Alejandra Ayanegui por aceptar ser parte del jurado de examen de grado y por el enriquecimiento al trabajo escrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca para estudios de maestría no. 189926 y de la beca de doctorado no. 165530. También por el financiamiento del proyecto de investigación de ciencia básica SEP-CONACyT 83123 “Establecimiento de un modelo de caracterización epidemiológica molecular de *Leptospira* mediante MLST” y apoyos integrales para la formación de doctores en ciencias financiado por los proyectos: PAPIIT IN222806 “GspD la supuesta proteína del T2S de *Leptospira*”, PAPIIT IN221409 “Inmunogenicidad de la secretina GspD y otros componentes del sistema de secreción tipo 2 (T2S) de *Leptospira*”, Macroproyecto no. 7, UNAM, área 2. Seroepidemiología de enfermedades infecciosas.

# ÍNDICE

	pg
Resumen	1
Summary	2
CAPÍTULO 1. Revisión de literatura	3
1.1 Epidemiología de la leptospirosis	4
1.2 Leptospirosis: Relación Hospedero-Parásito	7
1.3 Agente etiológico	10
1.4 <i>Leptospira</i> : Historia de su clasificación	10
1.5 Clasificación	14
1.6 Morfología	16
1.7 Movilidad	17
1.8 Metabolismo	19
1.8.1 Desarrollo <i>in vitro</i>	21
1.9 Factores de patogenicidad	21
1.10 Organización genética del género <i>Leptospira</i>	23
1.10.1 Cromosomas I y II	23
1.10.2 Islas de patogenicidad	36
1.10.3 Elemento extracromosómico	36
1.10.4 Secuencias de inserción (IS)	36
1.10.5 Variaciones genéticas asociadas a la transferencia de material genético	38
1.11 Los sistemas de secreción	40
1.11.1 Los sistemas de secreción encontrados en el género <i>Leptospira</i>	44
1.11.1.1 El sistema de secreción tipo I (T1S)	44
1.11.1.2 El sistema de secreción tipo II (T2S)	46
1.11.2 <i>gspD</i> su presencia en el género <i>Leptospira</i>	49
1.12 Diagnóstico de leptospirosis y caracterización de leptospiras	51

1.12.1 Aislamiento del microorganismo	51
1.12.2 Microscopía de campo oscuro (CO)	52
1.12.3 Pruebas serológicas	52
1.12.3.1 Aglutinación microscópica (AM) y caracterización serológica de aislados (serotipificación)	52
1.12.3.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	54
1.12.3.3 Fijación del complemento	54
1.12.3.4 Aglutinación en microcápsula (MCAT)	54
1.12.3.5 Inmunofluorescencia (IF)	55
1.12.3.6 Inmunohistoquímica	55
1.12.3.7 Hemoaglutinación (HAI)	56
1.12.4 Estudios patológicos	56
1.12.5 Pruebas moleculares	57
1.12.5.1 Hibridación de ácidos nucleicos	57
1.12.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
1.12.5.3 Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	58
1.12.5.4 Electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE)	58
1.12.5.5 DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD)	60
1.12.5.6 Amplificación de fragmentos polimórficos fluorescentes (FAFLP)	62
1.12.5.7 Número variable de repeticiones en tándem (VNTRs)	63
1.12.5.8 Electroforesis de múltiples enzimas (MLEE)	67
1.12.5.9 Tipificación por Secuenciación de <i>locus</i> Múltiples (MLST)	69
CAPÍTULO 2. Hipótesis	75

CAPÍTULO 3. Objetivos	76
3.1 Objetivo general	76
3.2 Objetivos específicos	76
CAPÍTULO 4.	77
ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>Leptospira borgpetersenii</i> SEROVAR Ballum.	78
Abstract	79
Introduction	80
Materials and Methods	82
Results	86
Discussion	89
References	94
CAPÍTULO 5.	105
DETECCIÓN DE <i>Leptospira santarosai</i> Y <i>L. kirschneri</i> EN BOVINOS: NUEVOS AISLADOS CON POTENCIAL IMPACTO EN PRODUCCIÓN BOVINA Y SALUD PÚBLICA.	106
Abstract	108
Resumen	109
Introducción	110
Material y Métodos	112
Resultados	116
Discusión	118
Referencias	122
CAPÍTULO 6.	135
COMPARISON OF TWO MULTILOCUS SEQUENCE TYPING SCHEMES AND THE INCLUSION OF <i>gspD</i> ON CHARACTERIZATION OF <i>Leptospira</i> ISOLATES.	135
Summary	137
Background/Introduction	138
Material and Methods	140
Results	144
Discussion	148

References	154
CAPÍTULO 7. Discusión	165
CAPÍTULO 8. Referencias bibliográficas	169



## ÍNDICE DE CUADROS

	pg
Cuadro 1: Características de la leptospirosis en el hospedero de mantenimiento y accidental	8
Cuadro 2: Serovariedades más reportadas en diversas especies animales	9
Cuadro 3: Ejemplos de serogrupos y serovariedades presentes en el género <i>Leptospira</i> (patógenas y apatógenas)	13
Cuadro 4: Especies de <i>Leptospira</i> asociadas con los serogrupos	15
Cuadro 5: Comparación entre los cromosomas de <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> y <i>L. biflexa</i>	34
Cuadro 6: Componentes del sistema de secreción tipo I (T1S)	45
Cuadro 7: Componentes del sistema de secreción tipo II (T2S) en <i>Leptospira</i>	47
Cuadro 8: Serovariedades de <i>Leptospira</i> indistinguibles o estrechamente relacionadas por electroforesis de campos pulsados	60
Cuadro 9: Páginas electrónicas de MLST y microorganismos en los que se ha aplicado la técnica	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pg
Figura 1: Triada epidemiológica de la leptospirosis	5
Figura 2: Representación esquemática de la relación entre los Spirochaetes con otras bacterias	10
Figura 3: Espiroqueta en piel de cobayo y orina de pacientes	12
Figura 4: Representación esquemática de <i>Leptospira</i>	16
Figura 5: Microscopía de campo oscuro (3,000x) de un cultivo de leptospiras	18
Figura 6: Movimiento de <i>L. illini</i> en medio líquido	19
Figura 7: Diagrama circular de la estructura cromosómica de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Lai	25
Figura 8: Mapas circulares de los cromosomas del genoma de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni	27
Figura 9: Inversión del cromosoma I de serovariedades de <i>Leptospira interrogans</i>	28
Figura 10: Mapas de los cromosomas de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo	30
Figura 11: Comparación de los cromosomas grandes (CI) de <i>Leptospira</i>	31
Figura 12: Mapa circular de los tres replicones de <i>L. biflexa</i>	32
Figura 13: Sintenia entre los genomas de <i>Leptospira</i>	35
Figura 14: Fotografía electrónica que muestra el fenómeno de conjugación entre <i>Escherichia coli</i> y <i>Leptospira biflexa</i>	39
Figura 15: Modelo de ensamble del sistema de secreción tipo I (T1S)	45
Figura 16: Modelo de ensamble del sistema de secreción tipo II (T2S)	46
Figura 17: Representación esquemática de los <i>loci gsp</i> de diferentes especies de <i>Leptospira</i>	48
Figura 18: Árbol filogenético basado en las secuencias de <i>gspD</i> de cinco serovariedades de <i>Leptospira</i> y 15 géneros de bacterias Gram negativas	50

Figura 19: PFGE de serovariedades del serogrupo Canicola cortadas con <i>NotI</i>	59
Figura 20: RAPD de serovariedades de leptosiras	61
Figura 21: Representación esquemática de la técnica de AFLP	62
Figura 22: Alineación de la secuencia de los <i>loci</i> VNTR19	65
Figura 23: Dendrograma de los VNTRs de las serovariedades de <i>Leptospira interrogans</i>	66
Figura 24: Filograma que representa la relación genética del género <i>Leptospira</i> por MLEE	69

## RESUMEN

Actualmente, existen dos esquemas principales de tipificación para *Leptospira* por MLST (tipificación por secuenciación de *locus* múltiples), el primero propuesto para *L. interrogans* (intra-especie) y otro para clasificar cepas de 6 especies (inter-especie). Las dos propuestas difieren completamente en cuanto el número y tipo de genes utilizados, así mismo, carecen de una evaluación de los genes utilizados y existe incertidumbre sobre la utilidad de cada uno. Por lo que en el presente trabajo, se realizó una comparación de las dos propuestas a la vez que se evaluó el gen *gspD* codificante de la secretina del sistema de secreción tipo II de *Leptospira* para mejorar un esquema de caracterización por MLST. El sistema mejorado fue aplicado para la caracterización de 18 aislados obtenidos en México y 12 cepas de referencia de 6 especies patógenas de *Leptospira*. Los tipos de secuencia obtenidos (STs), se compararon con las bases de datos; con el esquema inter-especie (Ahmed *et al.*, 2006), se logró obtener el ST de todas las cepas y aislados utilizados, mientras que con el esquema intra-especie (Thaipadungpanit *et al.*, 2007), sólo se obtuvieron los STs de las cepas y aislados de *L. interrogans* y *L. kirschneri*. Los aislados CEL60, LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59 y UADY22 de origen canino y Sinaloa ACR de origen porcino, compartieron el mismo ST que la cepa Canicola Hond Utrecht IV; los aislados de ratón Cran13, Cran14 y Cran28, compartieron el ST con la cepa Ballum Mus 127; los aislados Palo Alto y LOVE30 tuvieron el mismo ST que la cepa Icterohaemorrhagiae RGA; los aislados de bovino CAL6 y H89 compartieron el ST con la cepa Hardjoprajitno; en contraste los aislados de bovinos CAL4, CAL7 y MOCA45 mostraron STs nuevos, solo reportados en México. La cantidad de fragmentos amplificados por PCR y el número de sitios polimórficos obtenidos fue mayor utilizando el gen *gspD* en comparación con los genes utilizados en ambas propuestas. MLST es una técnica que permite identificar la especie y serovariedad de cepas de *Leptospira*; *gspD*, mostró un mejor poder discriminatorio para ser utilizado en MLST.

## SUMMARY

*Leptospira* is classified into 14 pathogenic species, including more than 25 serogroups and 260 serovars that cause leptospirosis, a zoonotic and infectious disease affecting domestic and wild animals. There are two main MLST schemes, for *L. interrogans* typification, an intra-species scheme (Thaipadungpanit *et al.*, 2007) and an inter-species scheme (Ahamed *et al.*, 2006). The two proposals are completely different, there is not evaluation of the genes used and there is uncertainty about the usefulness of each scheme. A comparison of the two proposals was performed. In addition, the *Leptospira* type II secretion system secretin *gspD* encoding gene was used for the characterization of 18 isolates obtained from Mexico, as well as 18 reference strains from 6 pathogenic species. Their sequence types (STs) were compared with the databases of each proposal. The Inter-species scheme was suitable to obtain the sequence type (ST) from all strains and isolates used, whereas with the intra-species scheme only the STs of strains of the species *L. interrogans* and *L. kirschneri*, were obtained. Dog isolates CEL60, LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59 UADY22 and the porcine isolate Sinaloa ACR, showed the same ST as serovar Canicola strain Hond Utrecht IV; the mouse isolated CRAN13, CRAN14 and CRAN28 shared the same ST with serovar Ballum strain Mus 127; isolates LOVe30 and Palo Alto showed the same ST as that of serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA and the bovine isolates CAL6 and H89 had the same ST than serovar Hardjo strain Hardjoprajitno. In contrast, the CAL4, CAL7 and MOCA45 bovine isolates showed new STs not previously reported in Mexico. The amount of PCR amplified fragments and the number of polymorphic sites obtained with *gspD* was higher than the values of the genes used in the two proposals. The inter-species MLST scheme is more discriminatory, allowing the identification at the *Leptospira* species and serovar level; *gspD* showing a better discriminatory power to be used in MLST.

## CAPITULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por diferentes especies de espiroquetas patógenas del género *Leptospira* <sup>[1,2]</sup>, que afecta tanto a mamíferos domésticos como a silvestres y es considerada una de las zoonosis más difundidas en el mundo <sup>[3-5]</sup>.

La leptospirosis tiene una distribución geográfica amplia y se presenta principalmente en las zonas tropicales, subtropicales y templadas. En la mayoría de los países de la región del sureste asiático la leptospirosis es endémica, en promedio se producen anualmente en el mundo 10,000 casos graves que requieren hospitalización <sup>[6]</sup>.

La leptospirosis también es considerada una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la agricultura, limpieza de drenajes, minería y aquellos que tienen contacto directo o indirecto con animales <sup>[7-10]</sup>.

Por tal razón, en humanos la leptospirosis también es conocida como enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, fiebre del fango, fiebre de los pantanos, fiebre icterohemorrágica y fiebre del verano, entre otros. El hombre es introducido a la cadena epidemiológica de manera accidental ya que adquiere la infección por contacto directo con la orina de los animales infectados (domésticos o silvestres), o indirectamente por contacto con agua corriente o estancada, suelo húmedo o lodo contaminados con orina de dichos animales <sup>[11]</sup>.

En países desarrollados, la incidencia de la enfermedad se ha reducido considerablemente y la mayoría de los casos que ocurren actualmente son asociados a actividades recreativas con la exposición al agua contaminada. En contraste, la leptospirosis ha sido reconocida como un problema de salud pública emergente de proporciones importantes donde la incidencia parece estar aumentando en los países en vías de desarrollo <sup>[12, 13]</sup>.

El diagnóstico de leptospirosis es difícil de confirmar debido por un lado, a la gran diversidad de signos clínicos presentes en individuos enfermos, sean humanos o animales y por otra parte, a la difícil adaptabilidad del microorganismo a las condiciones de laboratorio, que lo hacen de aislamiento difícil y lento <sup>[14,15]</sup>. Por estos motivos, el diagnóstico principalmente se ha basado en técnicas de laboratorio indirectas como la detección de anticuerpos séricos mediante la prueba de Aglutinación Microscópica (AM) y la observación de leptospiras mediante microscopía de campo oscuro (CO), siendo esta última, una alternativa con poca sensibilidad y alto grado de inespecificidad <sup>[11, 16]</sup>.

Por tal motivo, se han usado otras alternativas de diagnóstico incluyendo las pruebas biológicas (inoculación en hámsteres o cuyos), histopatología con tinciones argénticas (Warthin Starry o Levaditi), estudios de laboratorio clínico, otras pruebas inmunológicas (ELISA, inhibición de la hemoaglutinación, aglutinación macroscópica, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica) y la detección de ADN de leptospiras patógenas en muestras clínicas <sup>[17-19]</sup>.

## **1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS**

Para que la leptospirosis se establezca, como cualquier infección, es necesaria la interacción de varios factores como la existencia de animales reservorios y portadores del agente, condiciones ambientales favorables (humedad relativa alta, temperatura templada, pH neutro), así como la presencia de un hospedero susceptible, lo que constituye la “triada epidemiológica” de la enfermedad <sup>[9]</sup> (Figura 1).

La epidemiología de la leptospirosis es compleja debido al amplio rango de serovariedades, posibles hospedadores, diversidad de nichos ecológicos y presentaciones clínicas participantes en la misma <sup>[20]</sup>.

El hábitat natural de serovariedades de *Leptospira* patógenas son los túbulos contorneados renales de los animales reservorios, mientras que el hábitat natural de las leptospiras no patógenas es el agua de estanques y lagos, por otro lado, el

ambiente ideal para la supervivencia de leptospiras patógenas fuera del huésped son las superficies de agua y lodo, donde pueden sobrevivir con las condiciones físico-químicas adecuadas como pH neutro a ligeramente alcalino, protegidas de la luz del sol y a temperaturas templadas (15°C) [21].

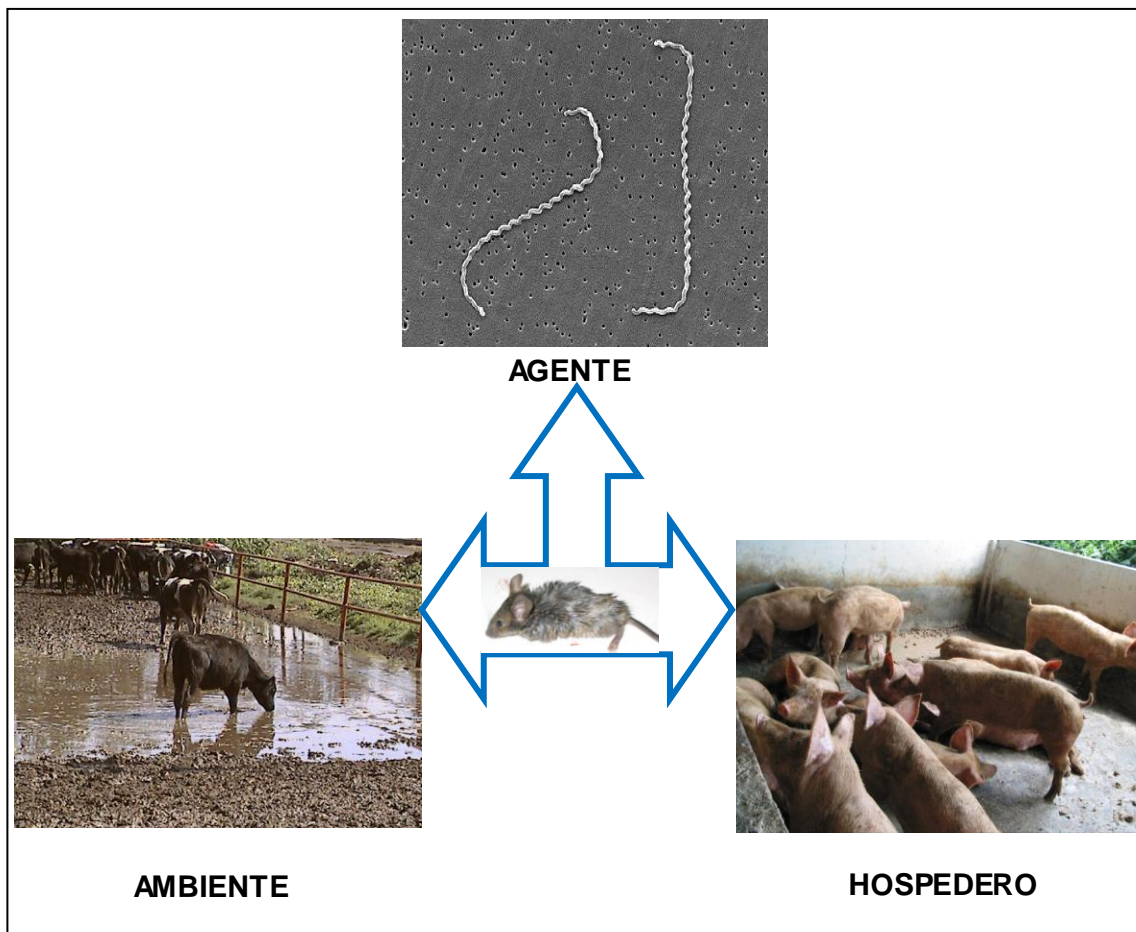


FIGURA 1: Triada epidemiológica de la leptospirosis.

La frecuencia de la leptospirosis aumenta durante los meses lluviosos y es endémica en zonas tropicales, pudiéndose presentar importantes que están asociados con un incremento inusual de las lluvias, inundaciones o desastres



naturales que aumenta la probabilidad de exposición del huésped con aguas contaminadas [22].

*Leptospira* no tolera la presencia o competencia con ciertas bacterias ambientales por lo tanto es importante que el agua donde se encuentre tenga una baja concentración bacteriana, en general las leptospiras pueden sobrevivir hasta seis meses en suelos saturados de agua, algunos meses en agua corriente y algunas semanas en agua estancada, pero pueden permanecer viables en agua destilada por 152 días. Trueba y colaboradores observaron una aparente agregación celular que favorece la supervivencia de *Leptospira* en medios acuosos [23]. También hay relación con otros microorganismos como *Sphingomonas* spp. que favorece la supervivencia de leptospiras patógenas en vida libre, a diferencia de la relación con *Flavobacterium* spp. la cual fue antagónica para *Leptospira*, lo que sugiere que su supervivencia en el ambiente puede estar influenciada por la composición de la microbiota presente en los nichos ecológicos [24].

*Leptospira* es altamente sensible a la acción de los agentes externos, medios ácidos, putrefacción, desecación, congelación, calor (50° C durante 10 minutos), antisépticos y desinfectantes de uso común (jabón, sales biliares, detergentes), así como a la acción de la mayoría de antibióticos, incluyendo penicilinas, sin embargo, es resistente a la neomicina, ácido nalidíxico y rifampicina [25].

La transmisión de la leptospirosis se produce más comúnmente de manera indirecta y ésta ocurre por exposición de animales susceptibles a fuentes de agua, suelo o lodo contaminados con orina de animales infectados y que generalmente ocasionan focos epidémicos [26]. La vía directa, ocurre por contacto a través de la piel erosionada y de las mucosas (bucal, nasal y conjuntival) con orina o fluidos uterinos de los animales infectados. También se puede dar la infección por transmisión venérea, por vía placentaria al feto y a través de los fluidos placentarios al exterior, por medio de la leche e ingesta de tejidos infectado, la frecuencia de transmisión aumenta con el hacinamiento [3, 22]. Por lo tanto, la transmisión indirecta de la leptospirosis puede aumentar cuando los factores ambientales son favorables para la supervivencia de *Leptospira*. En áreas áridas o

durante las sequías son más comunes las infecciones de huéspedes accidentales (el hombre principalmente), alrededor de fuentes de agua <sup>[27]</sup>.

## **1.2 LEPTOSPIROSIS: RELACIÓN HOSPEDERO-PARÁSITO**

Epidemiológicamente la infección por *Leptospira* se puede entender en dos amplias categorías: leptospirosis adaptada y no adaptada al hospedero. Un animal infectado con una serovariedad adaptada se comporta como un hospedero de “mantenimiento” o “reservorio”, en tanto la exposición de animales susceptibles a serovariedades no adaptadas produce una infección accidental. Algunas serovariedades tienen un hospedero de mantenimiento en particular, aunque pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos. Por lo tanto, una serovariedad se comporta de forma diferente dentro de su especie de mantenimiento que en un hospedero accidental <sup>[26]</sup> (Cuadro 1).

Las ratas (*Rattus norvegicus*, *R. rattus*), ratones (*Mus musculus*) y otros roedores, son considerados como los reservorios ecológicos más frecuentes de *Leptospira* <sup>[28, 29]</sup>. Por lo tanto, se consideran reservorios típicos de *Leptospira* a los roedores, en particular de las serovariedades Ballum, Icterohaemorrhagiae y Copenhageni; los perros de la serovariedad Canicola y otros animales domésticos como bovinos de la serovariedad Hardjo; los porcinos de las serovariedades Bratislava, Pomona y Tarassovi y los equinos de las serovariedades Bratislava y Pomona. Cuando estos animales se encuentran infectados por serovariedades adaptadas se presentan cuadros subclínicos o asintomáticos <sup>[28]</sup> (Cuadro 2).

**CUADRO 1: CARACTERÍSTICAS DE LA LEPTOSPIROSIS EN EL HOSPEDERO DE MANTENIMIENTO Y ACCIDENTAL**

<b>HOSPEDERO DE MANTENIMIENTO</b>	<b>HOSPEDERO ACCIDENTAL</b>
<p>Transmisión endémica entre individuos de la especie.</p> <p>Susceptibilidad alta a la infección pero patogenicidad relativamente baja.</p> <p>Tendencia a sufrir una enfermedad de curso crónico.</p> <p>Persistencia de la serovariedad en los riñones y el aparato genital.</p> <p>Una respuesta de anticuerpos baja frente a la infección, que dificulta el diagnóstico.</p> <p>Eficacia baja de la vacunación para prevenir la infección.</p>	<p>Susceptibilidad relativamente baja a la infección, pero una patogenicidad alta para el hospedero.</p> <p>Tendencia a sufrir una enfermedad aguda, en lugar de crónica.</p> <p>Transmisión esporádica en la especie del hospedero y adquisición de la infección de otra especie, a menudo, en forma epidémica.</p> <p>Una fase renal (leptospiuria) corta.</p> <p>Una respuesta de anticuerpos intensa frente a la infección, facilitando el diagnóstico.</p> <p>Las vacunas son más eficaces para prevenir la infección.</p>

Modificado de Radostits Otto M 1999. <sup>[26]</sup>

La asociación con hospederos accidentales usualmente desencadena una leptospirosis aguda por ejemplo: bovinos con Pomona, perros con Icterohaemorrhagiae y humanos con todas las serovariedades. Sin embargo, esta asociación no es absoluta y bajo ciertas circunstancias varias serovariedades pueden infectar diversas especies que se caracterizan por ser excretoras de corta duración con cuadros clínicos aparentes <sup>[26]</sup>.

CUADRO 2: SEROVARIEDADES MÁS REPORTADAS EN DIVERSAS ESPECIES ANIMALES

SEROGRUPO	SEROVARIEDAD	HOSPEDERO						
		Bovino	Cerdo	Perro	Equino	Oveja	Roedor	Animales silvestres
Australis	Australis	+						+
	Bratislava	+	+		+			
Autumnalis	Autumnalis						+	+
Ballum	Ballum						+	+
Bataviae	Bataviae	+					+	
Canicola	Canicola	+	+	+			+	+
Grippotyphosa	Grippotyphosa	+	+	+	+		+	+
Hebdomadis	Hebdomadis							+
	Szwajizak	+						
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	+	+	+	+		+	+
	Copenhageni	+		+			+	
Pomona	Pomona	+	+	+	+	+		+
Sejroe	Balcanica	+						
	Hardjo	+			+	+		
	Saxkoebing	+						
	Sejroe	+					+	+
Tarassovi	Tarassovi		+					

Modificado de Quinn PJ 2002 <sup>[30]</sup> .

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

*Leptospira* Pertenece al Reino Bacteria (eubacteria); phylum Spirochaetes; clase Spirochaetes; orden Spirochaetales; familia Leptospiraceae; género *Leptospira* (Figura 2).

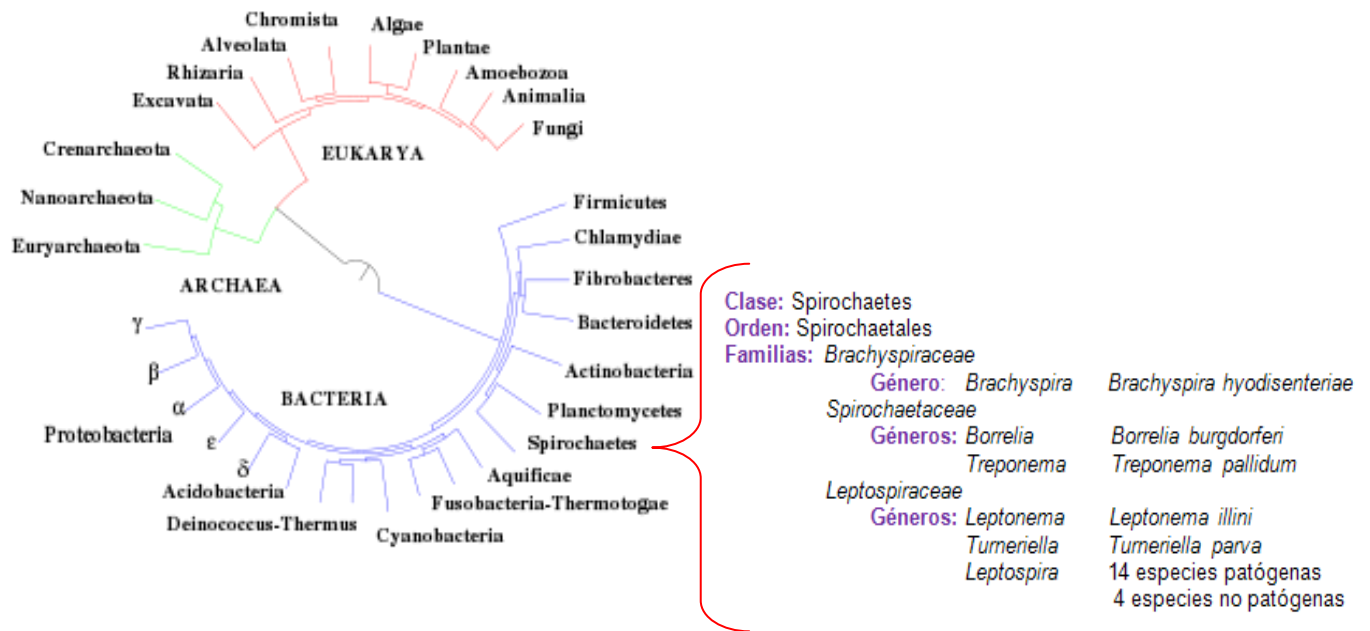


FIGURA 2: Representación esquemática de la relación entre los Spirochaetes con otras bacterias.

### 1.4 *Leptospira*: HISTORIA DE SU CLASIFICACIÓN

Aún cuando Mathieu en Francia y Adolf Weil en Alemania, en 1886 describieron cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de daño renal [3, 31], no fue hasta 1907 cuando Stimson, utilizando la técnica de Levaditi realizó tinciones en secciones de tejido renal donde observó numerosas estructuras con morfología en espiral y con ganchos en sus extremos, a las cuales denominó “*Spirochaeta interrogans*”, considerándose ésta la primera descripción de la morfología de *Leptospira* [31].

En 1914, Wolbach y Binger, observaron al microscopio de campo oscuro preparaciones de agua estancada teñidas con la técnica de Giemsa, donde observaron espiroquetas que, debido a su morfología y movimiento, denominaron “*Spirochaeta biflexa*” [32].

Inada e Ido durante los años de 1914 y 1915 en Japón, descubrieron y aislaron por primera vez al agente etiológico en sangre en un paciente con enfermedad de Weil, reportándolo como una “espiroqueta” y a la cual denominaron “*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*” [33] (Figura 3).

En 1915, los alemanes Huebener y Reiter, también reportaron la enfermedad de Weil, demostrando la presencia de cuerpos en forma de flagelos en la sangre de pacientes, denominándolos “*Spirochaeta nodosa*” [34]. En el mismo año, Uhlenhuth y Frommee reportaron por primera vez la leptospirosis anictérica que era causada por una espiroqueta similar a la anteriormente descrita y a la que denominaron “*Spirochaeta icterogenes*” [35].

La creación del género *Leptospira* se atribuye al investigador japonés Hideyo Noguchi quien al haber estudiado varias cepas aisladas en diferentes lugares (Japón, Bélgica y Estados Unidos), entre 1917 y 1918 y con base en su morfología y características generales, finalmente la denominó *Leptospira* [36]. Durante esos años, los investigadores notaron que los aislados obtenidos reaccionaban de manera diferente al ser enfrentados a sueros de pacientes que habían padecido la enfermedad, esta característica sentó las bases para la clasificación serológica del microorganismo. Desde entonces alrededor de 268 serovariedades patógenas han sido descritas [37,38] (Cuadro 3).

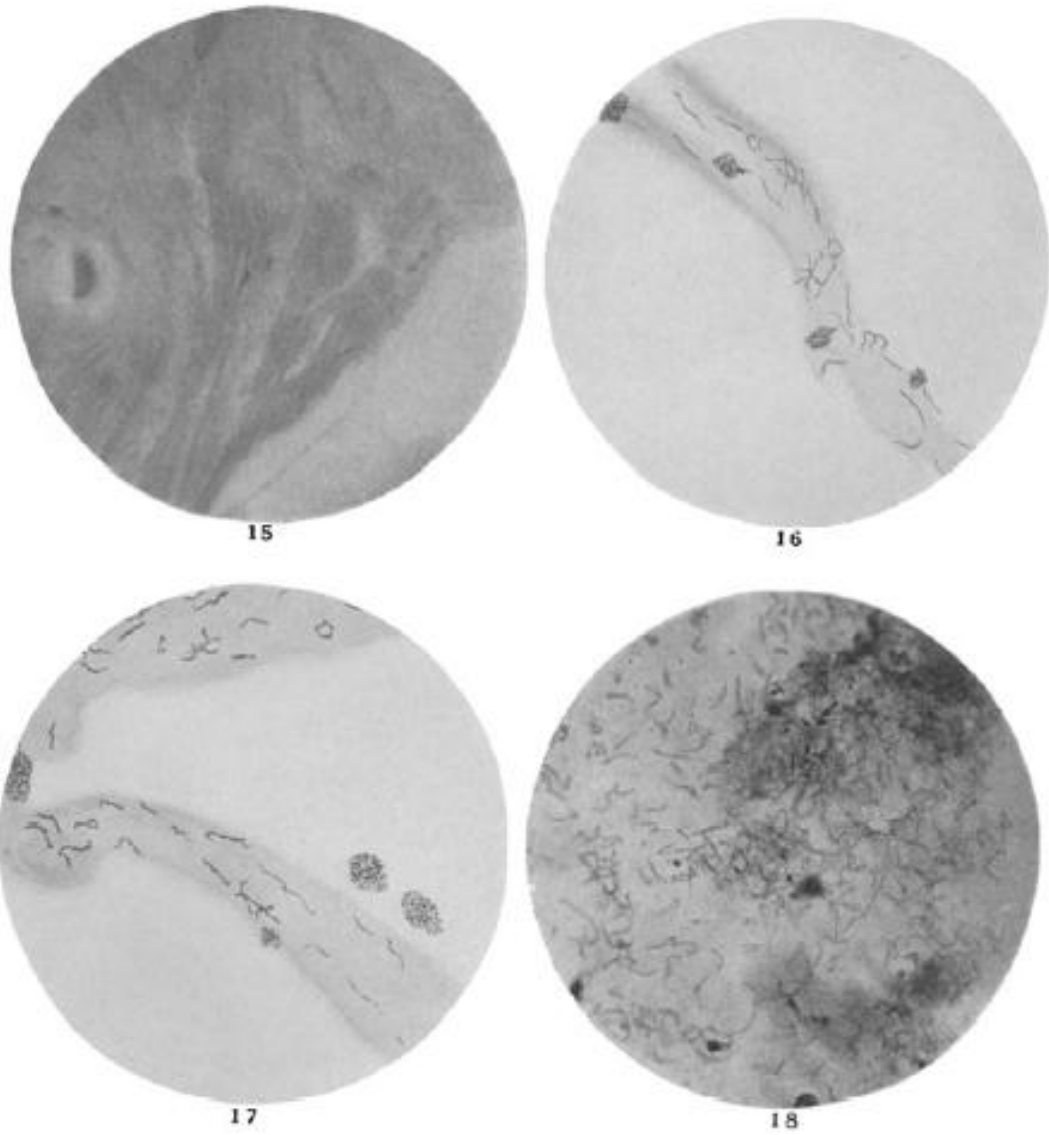


FIGURA 3: 15) Espiroqueta en piel de cobayo 10 horas después de la infección. 16, 17 y 18) Espiroquetas escretadas en orina de pacientes. Tomado de Inada *et al.* (1916)<sup>[33]</sup>.

CUADRO 3: EJEMPLOS DE SEROGRUPOS Y SEROVARIEDADES PRESENTES EN EL GÉNERO *Leptospira* (PATÓGENAS Y APATÓGENAS)

<b>LEPTOSPIRAS PATÓGENAS</b>	
<b>SEROGRUPO</b>	<b>SEROVARIEDAD</b>
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Ballum	Ballum, Arborea
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Hurstbridge	Hurstbridge
Icterohaemorrhagiae,	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Javanica	Javanica
Louisiana	Louisiana, Lanka
Lyme	Lyme
Manhao	Manhao
Mini	Mini, Georgia
Panama	Panama, Mangus
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Ranarum	Ranarum
Sarmin	Sarmin
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
No identificadas	AGC, Peru, Wawain, 83-015437, 84011370
<b>LEPTOSPIRAS APATÓGENAS</b>	
<b>SEROGRUPO</b>	<b>SEROVARIEDAD</b>
Andamana	Andamana
Codice	Codice
Semarang	Patoc, Saopaulo, Semarang
No identificadas	Biflexa, Gent, Holland

Modificado de *Leptospira* molecular biology homepage Institut Pasteur ([www.pasteur.fr/rescherche/leptospira.html](http://www.pasteur.fr/rescherche/leptospira.html))<sup>[39]</sup>.



## 1.5 CLASIFICACIÓN

La serovariedad es el taxón básico y fue formulado por Wolff y Broom en 1954, tanto para clasificar como para explicar, de forma práctica, la relación parásito-hospedador <sup>[40]</sup>. Esta identidad antigénica es resultante de diferencias en la estructura de las cadenas de carbohidratos del lipopolisacárido (LPS) <sup>[3, 41,42]</sup>. Por lo tanto, la amplia lista de serovariedades de leptospiras patógenas que existe actualmente refleja la importancia de la diversidad de la estructura del su LPS. Esta clasificación está basada en la respuesta serológica de *Leptospira* a sueros hiperinmunes en métodos de absorción-aglutinación y actualmente, se enlistan más de 260 serovariedades patógenas que se agrupan en más de 26 serogrupos. Mientras que leptospiras saprófitas agrupan actualmente a poco más de 60 serovariedades <sup>[43]</sup> (Cuadro 3).

Por otro lado, de acuerdo al análisis de la secuencia de los genes del ARN ribosomal (16S) y a estudios de hibridación de ácidos nucleicos, el sub-comité de expertos en *Leptospira* considera actualmente catorce especies patógenas de *Leptospira*: *L. alexanderi* (genomoespecie 2), *L. alstonii* (genomoespecie 1), *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomoespecie 3), *L. weilli*, y *L. wolffii* y seis especies de leptospiras saprófitas: *L. biflexa*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii* (genomoespecie 4), *L. wolbachii* y *L. yanagawae* (genomoespecie 5) <sup>[20, 44,45]</sup> (Cuadro 4).

Es importante aclarar que ambas clasificaciones (genética y antigénica) coexisten y que la mayor parte de la investigación epidemiológica y de diagnóstico se ha realizado con base en la clasificación serológica <sup>[3]</sup>. En varios casos, los miembros de diferentes especies son serológicamente indistinguibles y pertenecen a la misma serovariedad. Por ejemplo, distintas cepas de la serovariedad Hardjo pertenecen a las especies *L. interrogans* (Hardjoprajitno), *L. borgpetersenii* (Hardjobovis) y *L. meyeri* (Went 5) <sup>[43, 46]</sup>.

CUADRO 4: ESPECIES DE *Leptospira* ASOCIADAS CON LOS SEROGRUPOS

SEROGRUPO	ESPECIES
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Codice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. vanthielli</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Khorat	<i>L. Wolffi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alstonii</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semaranga	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i> , <i>L. yanagawae</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kmetyi</i>
Varillal	<i>L. lickersiae</i>
No designado	<i>L. terpstrae</i>
5399	<i>L. broomii</i>

Modificado de Levett PN 2001, Matthias *et al*, 2008, Slack *et al*, 2008, Slack *et al*, 2009 y *Leptospira* molecular biology homepage Institut Pasteur ([www.pasteur.fr/resherche/leptospira.html](http://www.pasteur.fr/resherche/leptospira.html)) [39, 43, 47-49]

## 1.6 MORFOLOGÍA

El género *Leptospira* comprende a un grupo de microorganismos que miden de 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud, tienen forma espiral (espiroquetas) y son altamente móviles debido a la presencia de dos flagelos periplásmicos<sup>[3, 50]</sup> (Figura 4).

Como otras espiroquetas, *Leptospira* tiene una pared celular con una estructura similar a la de bacterias Gram negativas con una membrana externa que está compuesta por proteínas, fosfolípidos y el LPS, que aunque mucho más corto que el de una típica bacteria Gram negativa, diferencia a las más de 260 serovariedades<sup>[51]</sup>.

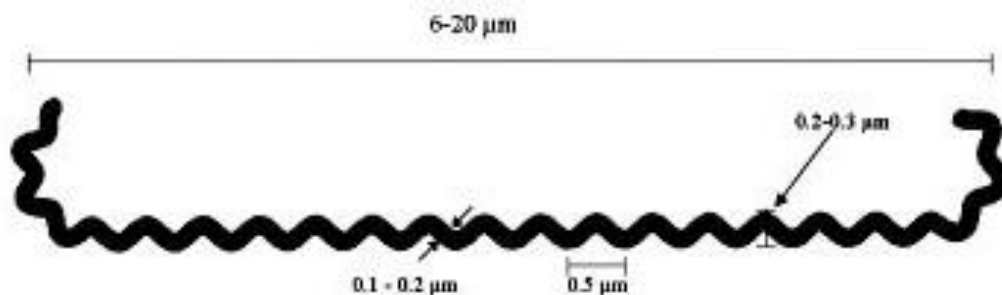


FIGURA 4: Representación esquemática de *Leptospira* que muestra su morfología característica terminada en ganchos, así como medidas del microorganismo largo, ancho y espacio entre espirales.

Las leptospiras presentan una composición antigénica compleja, los anticuerpos generados frente a los antígenos superficiales de la pared celular tienen carácter protector (LPS y PMEs); mientras que aquellos formados frente a los antígenos profundos (por ejemplo el flagelo), no son protectores ni específicos<sup>[52]</sup>. La variabilidad del LPS juega un papel importante en cuanto a la inmunogenicidad y se ha considerado el antígeno más importante en *Leptospira*<sup>[53]</sup>. Los anticuerpos

contra el LPS de *Leptospira* son protectores en ciertas especies animales como los hámsteres <sup>[52]</sup> pero no así en bovinos <sup>[54]</sup>.

Debido a que las leptospiras son extremadamente delgadas, no se pueden visualizar con los procedimientos de tinción habituales y para observarlas sin teñir se utiliza microscopía de campo oscuro (CO), de contraste de fases (CF) o electrónica <sup>[55]</sup> (Figura 5).

Por medio de microscopía de CO, se observan como finos filamentos espirales con extremos en gancho y con microscopía electrónica, se ha observado un cilindro protoplasmático enrollado alrededor de un filamento axial envuelto por la cubierta externa <sup>[56]</sup>. Algunas de las abundantes PMEs están expuestas a la superficie y pudieran estar involucradas en la patogénesis e inmunidad, muchas de ellas han sido estudiadas, predominantemente las de naturaleza lipoproteica LipL21, LipL32, LipL36 y LipL41 <sup>[57]</sup>.

El complejo peptidoglicano está separando de la envoltura externa por el espacio periplásmico y contiene una estructura fibrilar compuesta de ácido murámico <sup>[58]</sup>. El peptidoglicano es el responsable de su forma helicoidal y el contenido celular en el citoplasma comprende material nuclear, mesosomas y ocasionalmente inclusiones no identificadas <sup>[3]</sup>.

## 1.7 MOVILIDAD

*Leptospira* posee dos flagelos que se fijan uno en cada polo y se localizan en el espacio periplásmico entre la membrana externa y el peptidoglicano (endo-flagelos). Los flagelos tienen una estructura general semejante a la de otras bacterias Gram negativas y están constituidos por dos tipos de proteínas, el primero es una proteína con alta homología a las flagelinas bacterianas FlaA y que forma la médula del flagelo; mientras que el segundo tipo forma la envoltura del flagelo, FlaB. Ambas flagelinas son conservadas entre las distintas especies de *Leptospira* <sup>[59,60]</sup>.

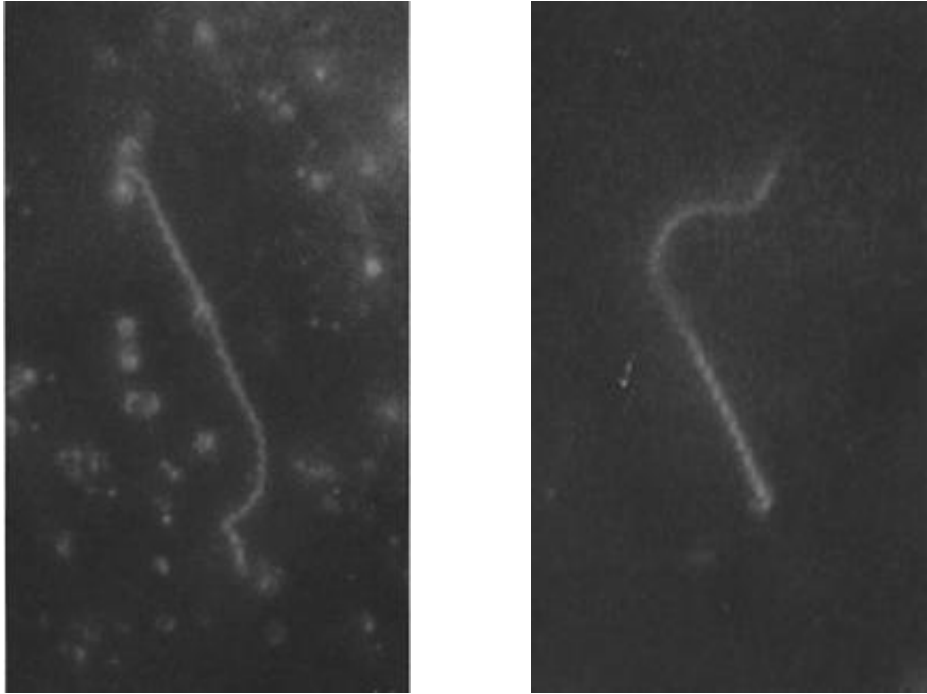


FIGURA 5: Microscópica de campo oscuro (3000 x) de un cultivo de leptospiras en medio semisólido con suero de conejo de 3 semanas de edad, aisladas a partir de ratas en Guayaquil en 1919 denominada por Hideyo Noguchi como "*Leptospira icterohaemorrhagiae*" cuando se creía que *Leptospira* era la causante de la fiebre amarilla. Tomado de Noguchi (1919) <sup>[61]</sup>.

Por otro lado, *Leptospira* posee ganchos en uno o ambos polos y tienen un movimiento de rotación sobre su eje longitudinal y de contorsión constantes en medios líquidos y semisólidos. El funcionamiento de los flagelos y el tipo de movilidad en espiroquetas es algo más complejo que en otras bacterias. Cuando los flagelos giran en dirección contraria a las manecillas del reloj el extremo de la célula asume una forma espiral y la célula tenderá a moverse en la dirección señalada por ese flagelo y si los dos flagelos giran en la dirección de las manecillas del reloj entonces los extremos adquieren la forma de gancho y la célula no se desplaza, entonces la célula rota sin moverse en una dirección definida <sup>[56]</sup> (Figura 6).

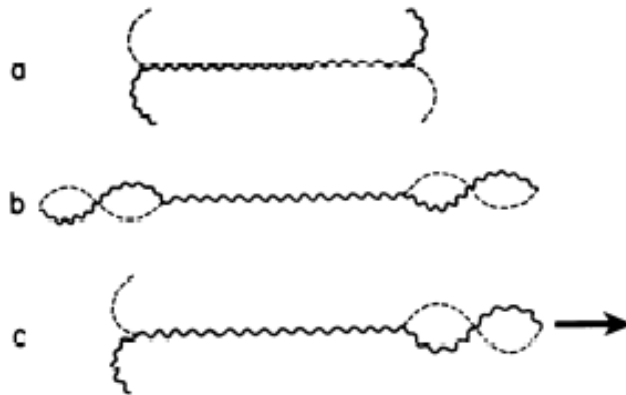


FIGURA 6: Movimiento de *L. illini* en medio líquido. A y B) Formas sin desplazamiento con los extremos (A) en terminación gancho-gancho o (B) en terminación espiral-espiral. C) Célula en movimiento que tiene un extremo terminal en gancho y el otro en espiral. Las células se mueven en dirección del gancho terminado en espiral. Tomado de Goldstein *et al.* (1990) <sup>[56]</sup>.

Se ha señalado que las leptospiras como otras espiroquetas están adaptadas a medios viscosos a los que tienen una atracción conocida como viscotaxis <sup>[23]</sup>. En estos medios, las espiroquetas desarrollan una movilidad direccional y su capacidad de desplazamiento no es superada por otras bacterias. Esta movilidad similar a la de un sacacorchos, probablemente contribuye a la capacidad invasiva de esta bacteria, así como, a la supervivencia del microorganismo fuera del hospedador <sup>[23]</sup>.

## 1.8 METABOLISMO

Las leptospiras son microorganismos aerobios o microaerófilicos cuya temperatura óptima de desarrollo está comprendida entre 28 y 30 °C con un pH de 7.2 a 7.6. Su tiempo medio de replicación es de unas 12 a 24 horas <sup>[3]</sup>. Las leptospiras son microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y su principal

fuentes de energía son ácidos grasos de más de 15 carbonos (cadena larga), que son requeridos como fuente de lípidos celulares y también como principal fuente de carbono para la  $\beta$ -oxidación, las leptospiras no pueden sintetizar ácidos grasos *de novo*. No fermentan los azúcares ni pueden utilizarlos como fuente de carbono, pero pueden sintetizarlos por medio del ciclo del ácido tricarboxílico [62,63].

Los ácidos grasos utilizados para las rutas metabólicas energéticas son probablemente liberados de los fosfolípidos por medio de fosfolipasas. Algunos otros requerimientos son vitamina B1 (tiamina), B12 (cianocobalamina), algunas cepas también requieren vitamina B6 (biotina), cloruro de amonio (como fuente de nitrógeno celular), piruvato de sodio (en los primeros cultivos a partir de muestras clínicas) [64,65].

En contraste con la mayoría de las células procariotas, las leptospiras incorporan bases púricas (adenina y guanina) pero no bases pirimídicas (timina y citocina) exógenas en sus ácidos nucleicos. Razón por la cual no desarrollan en presencia de 8-azaguanina, (análogo de las bases púricas), pero sí en presencia de 5-fluoruracilo (análogo de las bases pirimídicas) [66,67], siendo este último compuesto utilizado como inhibidor bacteriano en los cultivos de leptospiras.

Todas las leptospiras son oxidasa y peroxidasa positivas, la enzima catalasa está presente en todas las cepas patógenas pero ausente en las cepas apatógenas [68]; muchas de ellas tienen actividad lipolítica y algunas producen ureasa. Se ha reportado que *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* no producen lipasas, pero estudios moleculares más recientes contradicen estos reportes. Sin embargo, debido a que tienen un débil metabolismo y por su dificultad para desarrollarse *in vitro*, no es posible aplicar pruebas bioquímicas para su identificación. Por lo tanto la identificación, más allá del género, tradicionalmente se ha basado en reacciones de aglutinación-adsorción con sueros hiperinmunes específicos [3].

### **1.8.1 DESARROLLO *in vitro***

Los medios tradicionales para cultivo *in vitro* son esencialmente de dos tipos, aquellos que contienen suero de conejo en concentraciones que van del 8 al 10% (Stuart, Fletcher, Korthof, Cox) y los que utilizan la fracción V de la albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (EMJH) <sup>[69]</sup>. El medio sintético EMJH (Ellinghausen y McCulloch modificado por Johnson y Harris) con albúmina sérica bovina y polisorbato (Tween 80), es considerado un medio superior en comparación con otros medios de cultivo tradicionales <sup>[62]</sup>. Los ácidos grasos libres, producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas por lo que el medio se tiene que suplementar con la fracción V de la albúmina bovina que actúa como un destoxicante y estabilizador, al ser capaz de unir a su estructura los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y de esta forma, neutralizar su actividad citolítica. Este medio es actualmente el más utilizado para el aislamiento y cultivo de cepas de *Leptospira* <sup>[70,71]</sup>.

La mayoría de los medios de cultivo son líquidos o semisólidos y sólo se observa desarrollo después de transcurrida una semana en cepas ya adaptadas a condiciones de laboratorio, en contraste, los primeros cultivos pueden requerir hasta las 13 semanas o más de incubación <sup>[43]</sup>. En medio líquido, el desarrollo se aprecia por turbidez discreta, mientras que en los medios semisólidos, el desarrollo inicial es fácil de visualizar como uno o más anillos densos de desarrollo situado aproximadamente 0.5 cm por debajo de la superficie del medio, a este desarrollo se le denomina “anillo de Dinger” o “zona de Dinger” <sup>[69]</sup>.

## **1.9 FACTORES DE PATOGENICIDAD**

El término patogenicidad hace referencia a las propiedades genotípicas de los microorganismos, las cuales pueden o no ser expresadas, en cambio el término virulencia se refiere a las propiedades fenotípicas que son expresadas por un microorganismo produciendo cambios patológicos que afectan al hospedador <sup>[3]</sup>.



En *Leptospira* algunos factores potenciales de virulencia incluyen las hemolisinas, el LPS, glicolipoproteínas, peptidoglicano, proteínas de choque térmico y la flagelina entre otros, sin embargo, los mecanismos de patogenicidad aún no han sido esclarecidos con profundidad [72].

En el caso de las hemolisinas de *Leptospira* se ha sido sugerido que pueden ser fosfolipasas con actividad sobre eritrocitos y otras membranas celulares que contengan el sustrato fosfolípido desencadenando por consiguiente la citólisis. En 1986, fue purificada la esfingomielinasa C con actividad hemolítica a partir de *L. interrogans* serovariedad Pomona y posteriormente la de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo [73-75]. En otros estudios se comprobó la actividad citotóxica de la hemolisina SphH que no tiene actividad de esfingomielinasa o de otra fosfolipasa y que se sugiere que puede causar la formación de poros en la membrana del eritrocito con la consecuente lisis [76]. Otros ejemplos son las hemolisinas de las serovariedades Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi que son también esfingomielinasas. Las serovariedades Pomona y Copenhageni elaboran una proteína citotóxica que es detectada en el plasma de los animales infectados [28]. La movilidad y la respuesta quimiotáctica hacia la hemoglobina le permiten penetrar tejidos del hospedador durante la infección, lo que pudiera también estar asociado con virulencia [43].

El LPS de *Leptospira* tiene actividad endotóxica, es pirogénico, induce la secreción de interleucina 1 e interferón en macrófagos, así como la liberación del TNF $\alpha$  a partir de monocitos, lo que explica el daño a las células endoteliales, hemorragias, trombocitopenia, agregación plaquetaria y es mitógeno para células B, pero no para células T ni células NK (modelo murino), hay evidencias que puede causar trombocitopenia en animales y humanos infectados, esto acompañado de fibrinólisis con coagulación intravascular diseminada (CID), sin embargo es hasta diez veces menos potente que el LPS de bacterias Gram negativas [3].

Las cepas patógenas de *Leptospira* recién aisladas que son letales para los hámsteres, pierden rápidamente la virulencia después de repetidos subcultivos en medios artificiales, por lo tanto, estos cultivos pueden llegar a ser avirulentos. Sin

embargo, la virulencia se puede mantener si a estos cultivos se les realizan pases en sistemas vivos ya sean cobayos o hámsteres o bien si se congelan en nitrógeno líquido [69].

## **1.10 ORGANIZACIÓN GENÉTICA DEL GÉNERO *Leptospira***

### **1.10.1 CROMOSOMAS I Y II**

Los análisis tempranos de electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE) revelaron que el tamaño del genoma de *L. interrogans* es de 4.75 a 4.9 megabases (Mb) y tiene dos cromosomas circulares: el cromosoma I (CI) de 4.4 a 4.55 Mb y el cromosoma II (CII) de 350 Kb [77-80].

El CI se asemeja a los cromosomas de otros géneros bacterianos, pero con la característica única de la dispersión de los genes del ARNr codificantes de las subunidades 16S, 23S y 5S (genes *rrs*, *rrl* y *rrf* respectivamente), estos genes en la mayoría de las bacterias están agrupados y son co-transcritos [81]. El gen *rrf* fue identificado junto con el gen *jag*, un gen que normalmente se encuentran cerca de los orígenes de replicación del cromosoma y que codifican para una proteína de unión al ARN [78].

El CII está presente en todas las serovariedades patógenas de *Leptospira* y muestra una variación de tamaño [82], así mismo, existe en una proporción de 1:1 con respecto al CI [79]. El CII contiene genes responsables del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas [80].

La organización genética de las serovariedades Lai y Copenhageni de *L. interrogans*, genéticamente similares pero distintas serológicamente, se compararon, revelando que el genoma de *Leptospira* es muy variable, identificando varios reordenamientos (inserciones, deleciones e inversiones). Algunos cambios abarcan casi el 30% del genoma [80, 83]. En comparación, cuando tales reordenamientos ocurren en otros géneros bacterianos a menudo pierden su viabilidad, sin embargo, algunos cambios cromosómicos pueden estar asociados con la variación antigénica [84].

La primera secuencia completa del genoma de un representante de *Leptospira interrogans* fue el de la serovariedad Lai del serogrupo icterohaemorrhagiae, que consiste en un cromosoma grande de 4.33 Mb y un cromosoma pequeño 359 Kb, que codifican un total de 4,768 genes <sup>[85]</sup> (Figura 7). El genoma de *Leptospira interrogans* difiere ampliamente en cuanto a los genes que determinan las características fisiológicas de otras espiroquetas patógenas estrictamente parasitarias como *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi*, aunque existen similitudes en los genes que regulan sus características morfológicas. La secuenciación del genoma proporciona un análisis de los genes de quimiotaxis, motilidad y el descubrimiento de una serie de genes posiblemente relacionados con la adhesión, invasión y los cambios hematológicos que caracterizan a la leptospirosis, esto ha proporcionado pistas sobre cómo un organismo ambiental podría convertirse en un importante patógeno humano <sup>[1, 85]</sup>.

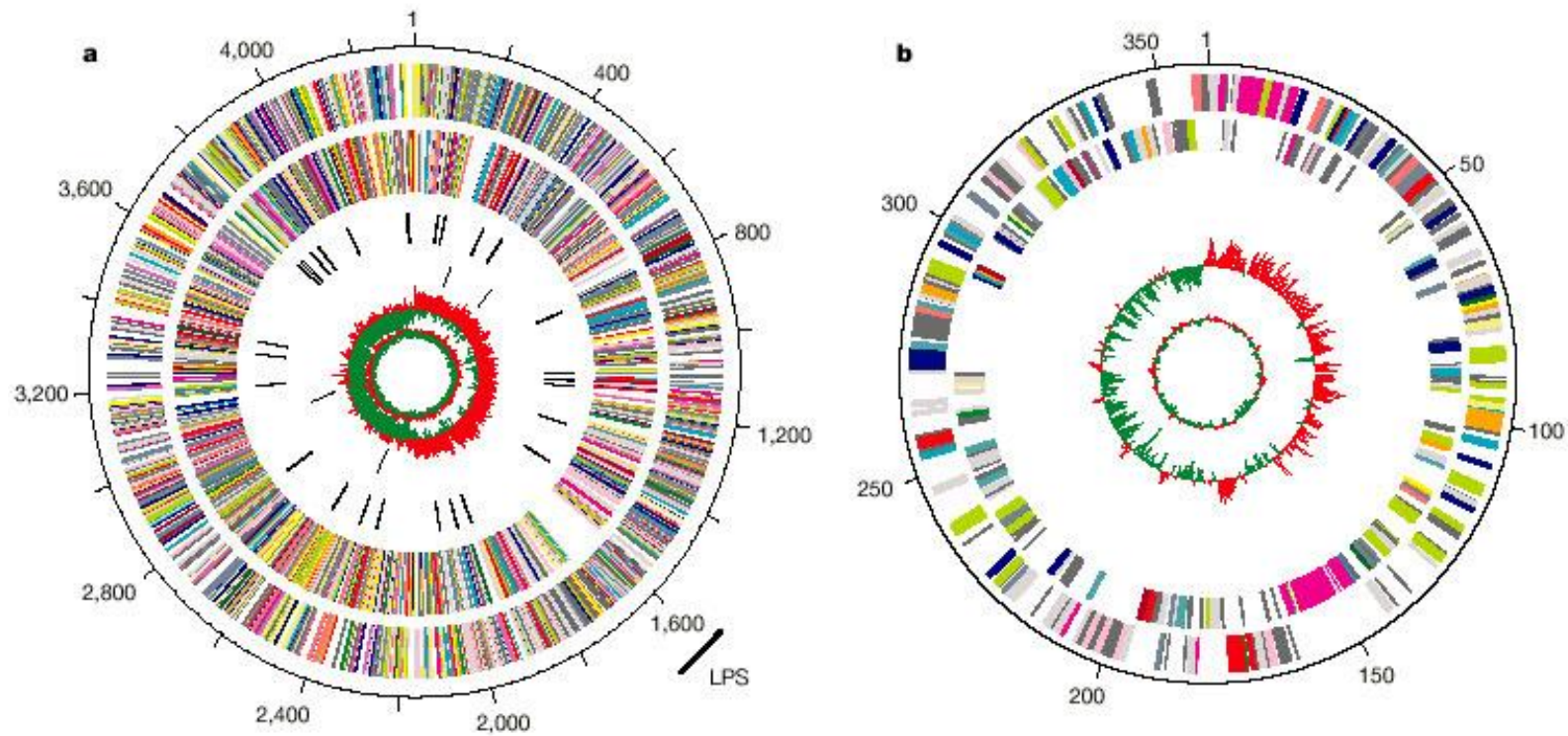


FIGURA 7: Diagrama circular de la estructura cromosómica de *L. interrogans* serovariedad Lai. A) cromosoma grande (CI), B) cromosoma pequeño (CII). La escala exterior es mostrada en kilobases. En el CI los círculos van del 1 (círculo exterior) al 6 (círculo interior). En el CII los círculos van del I (círculo exterior) a IV (círculo interior). Círculos de 1/I y 2/II son secuencias de los genes, adelantada y reversa; círculo 3, genes de ARNt; círculo 4, genes de ARNr; círculo 5/III, la parcialidad de GC ((G-C)/(G+C), el rojo indica los valores > 0; verde indica que los valores < 0); Círculos 6/IV indican el contenido de G + C. Todos los genes están codificados por color de acuerdo a las funciones: naranja para la biosíntesis de aminoácidos, verde para las purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos, azul para los ácidos grasos y metabolismo de los fosfolípidos, magenta para la biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y acarreadores, de color caqui para el metabolismo intermediario central, cian para el metabolismo energético, la orquídea para el transporte y las proteínas de unión, amarillo para el metabolismo del ADN, verde oscuro para la transcripción; café para la síntesis de proteínas; rojo para lipoproteínas, verde amarillento para funciones regulatorias; rosa para la pared celular; salmón para los procesos celulares; azul marino para otras categorías; gris claro para regiones conservadas; gris oscuro para proteínas hipotéticas, gris pizarra para proteínas de función desconocida y negro para el ARNt y ARNr. Tomado de Ren *et al.* (2003) <sup>[85]</sup>.

Posteriormente, en 2004 se realizó la comparación de los genomas de la serovariedad Lai con el de la serovariedad Copenhageni de *L. interrogans*, donde se reportó una gran inversión cromosómica y una variación amplia en el número y la distribución de secuencias de inserción (Figura 8). Además, existe una amplia gama de proteínas de regulación transcripcional y dos nuevas familias de adhesinas no fimbriales que potencialmente contribuyen a la colonización de los tejidos en los pasos iniciales de la infección <sup>[86]</sup> (Figura 9).

Los genomas de dos especies diferentes de *Leptospira* que varían en su distribución en la naturaleza y en el modo de transmisión fue comparado por Bulach *et al.*, en el año 2006, donde los genomas de dos serovariedades de *Leptospira interrogans* (Lai y Copenhageni) y dos genomas de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo con diferente fenotipo y virulencia. Mencionando que entre las dos cepas de Hardjo tienen un contenido genético casi idéntico, con algunas mutaciones puntuales. También existen algunas regiones limitadas de sintenia que se reparten entre los cromosomas grandes de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* que probablemente son el resultado de los eventos de recombinación producidas por las secuencias de inserción, el genoma de *L. borgpetersenii* es  $\approx$  700 kb más pequeño que el de *L. interrogans* y tiene una menor codificación (Figura 10). La pérdida de función de genes no es aleatoria, ya que el principal deterioro se encuentra en los genes de sobrevivencia en el medio ambiente, transporte y metabolismo. Estas características distinguen a *L. borgpetersenii* como una especie en declive genético, ya que de sobrevivir en ambientes acuáticos pasó a ser un parásito del bovino. Por tal razón, se concluye que *L. borgpetersenii* está evolucionando hacia la dependencia de un ciclo de transmisión estricto de hospedero a hospedero <sup>[87]</sup> (Figura 11).

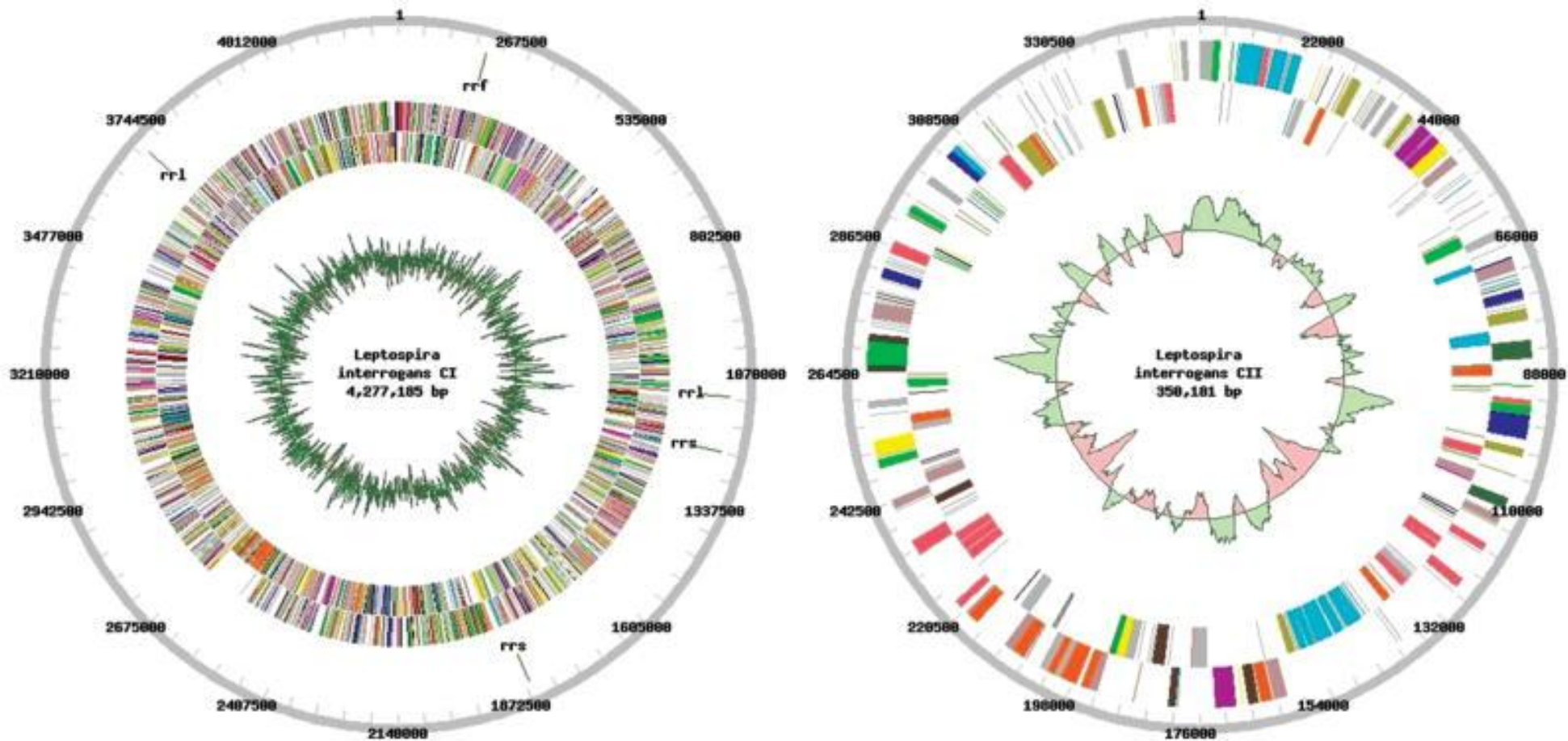


FIGURA 8: Mapas circulares de los cromosomas del genoma de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni. Los círculos 1 y 2 (de afuera hacia el interior, sentido adelantado y reverso de la cadena, respectivamente), son regiones predichas codificantes de proteínas. El color se refiere a la categoría del gen. El círculo 3 indica el contenido de G + C. Los números en el círculo exterior corresponden a los pares de bases. Genes del ARN, *rrl*, *rrs* y *rrf* que codifican para las subunidades 23S, 16S y 5S, respectivamente. Nota: los dos replicones no están esquematizados con misma escala. CII es 12 veces menor que CI. Tomado de Nascimento *et al.* (2004) <sup>[86]</sup>.

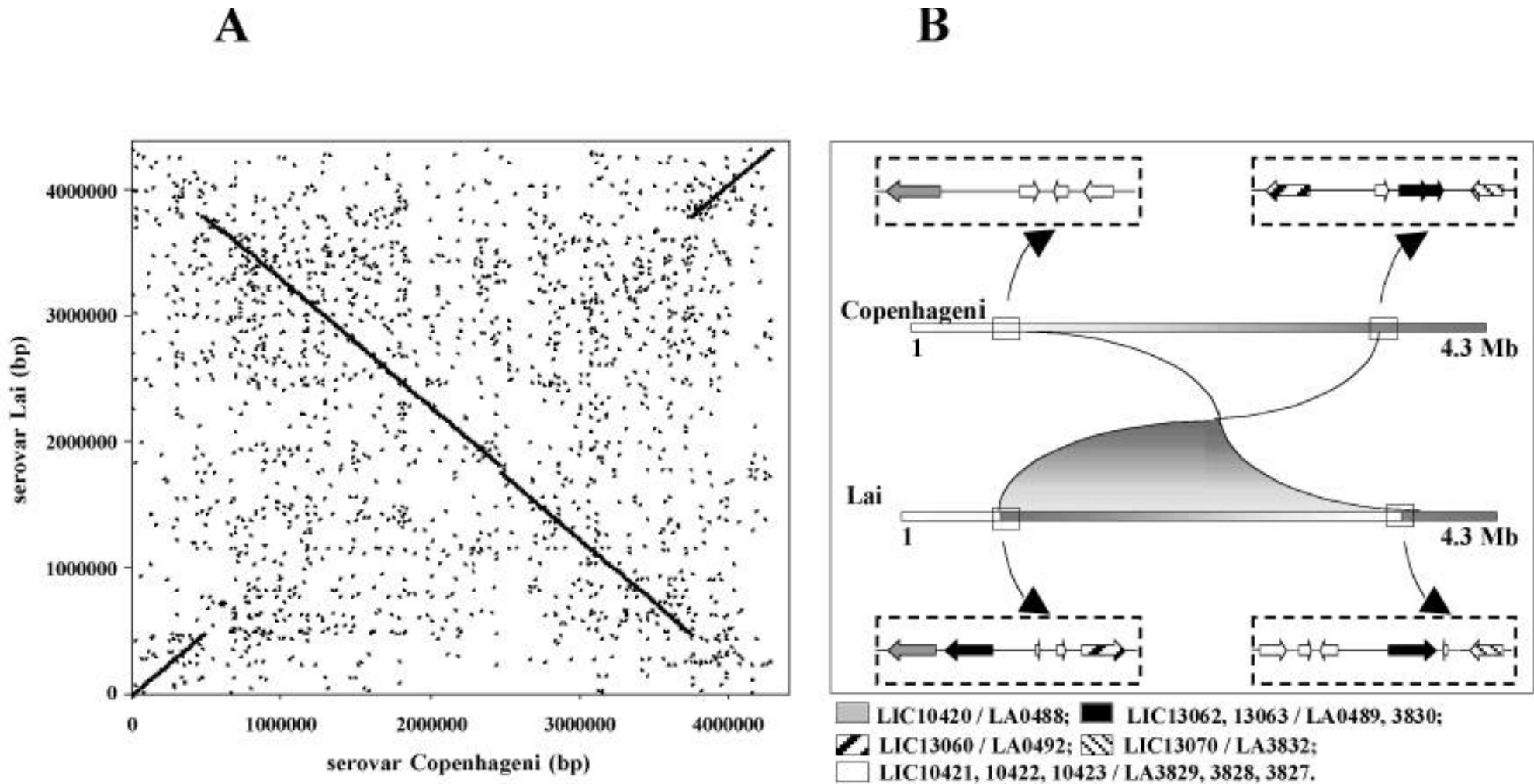


FIGURA 9: Inversión del cromosoma I de serovariades de *L. interrogans*. (A) Alineación de nucleótidos obtenidos, se basa en las coincidencias exactas de al menos 20 pb. Cada punto en la figura es un alineamiento exacto. Las líneas oscuras o diagonales principales resultan de la alta densidad de puntos con la identidad de secuencia a lo largo del cromosoma I de las dos serovariades. Los puntos dispersos fuera de las diagonales principales representan a otras regiones cortas con identidad de secuencia. (B) El esquema muestra los genes que flanquean los puntos de interrupción de la inversión. Los pares de genes ortólogos tiene la misma secuencia. Las flechas negras representan secuencias de inserción (ISs). Tomado de Nascimento *et al.* (2004) <sup>[86]</sup>.

De acuerdo a la comparación de genomas, se sugiere que *L. borgpetersenii* está experimentando la reducción del genoma mediado por secuencias de inserción lo que contribuye a numerosos reordenamientos cromosómicos, la formación de pseudogenes y en consecuencia, una codificación de menor cantidad de genes que *L. interrogans* <sup>[87]</sup>. Sin embargo, los cambios en la organización genética y la pérdida de genes no dañan la virulencia. Tanto *L. borgpetersenii* como *L. interrogans* pueden causar infecciones mortales en hospederos que no son de mantenimiento. La pérdida de genes en *L. borgpetersenii* parece afectar la tolerancia a la privación de nutrientes, incrementando la dependencia a un hospedero necesitando del contacto directo para la transmisión de la enfermedad <sup>[87]</sup>.



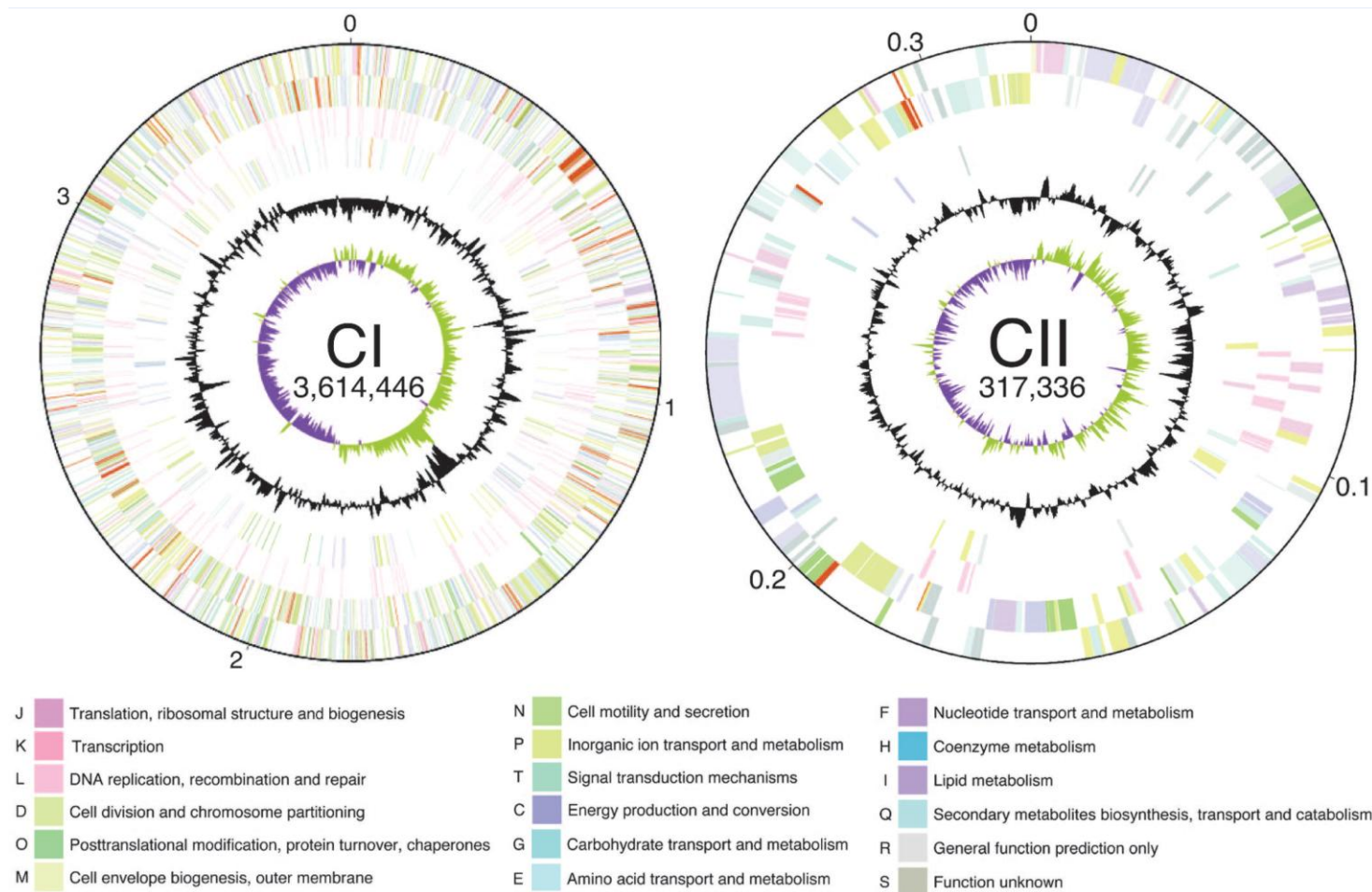


FIGURA 10: Mapas de los cromosomas de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo. Información funcional de los cromosomas los grande (CI) y pequeño (CII), se presentan en anillos concéntricos (los mapas no están dibujados a escala, el tamaño del replicón se muestran en pb). Empezando del exterior: genes codificantes (primer anillo), genes codificados en el fondo de la cadena (segundo anillo), transposasas (tercer anillo) y pseudogenes (cuarto anillo). Los genes están coloreados según las categorías funcionales correspondientes mostradas en la figura. El quinto anillo muestra las desviaciones del contenido GC a partir del promedio genómico calculado usando una ventana de 10 kb en los pasos de 1 kb; valores mayores que el promedio quedaron fuera del anillo y valores menores al promedio quedaron dentro del anillo. El anillo más profundo muestra sesgo de GC calculado, usando una ventana de 10 kb en pasos de 1 kb; se muestra sesgo positivo en color verde y el sesgo negativo en color púrpura. Tomado de Bulach *et al.* (2006) <sup>[87]</sup>.

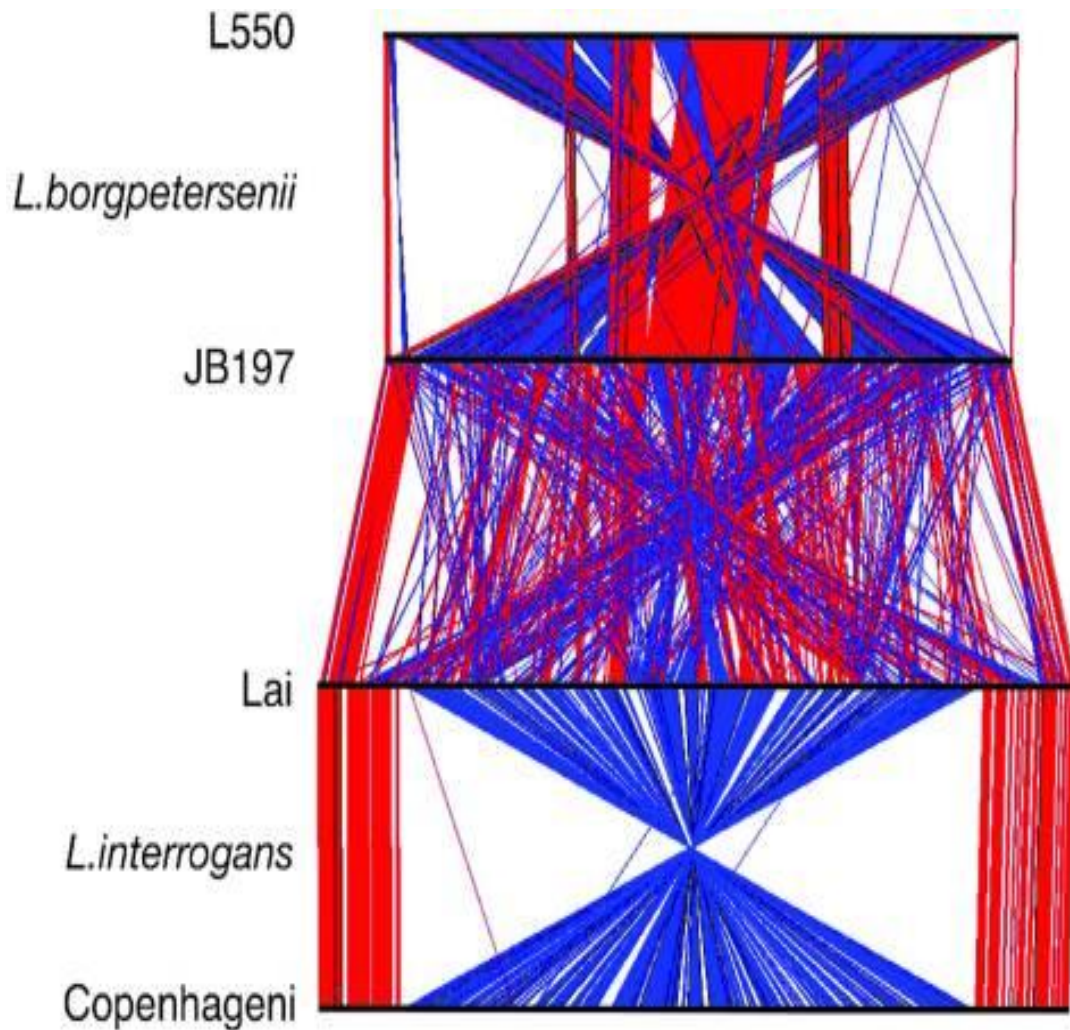


FIGURA 11: Comparación de los cromosomas grandes (CI) de *Leptospira*. Los cromosomas I de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepas L550 y BJ197 y *L. interrogans* serovariedades Lai y Copenhageni. Las líneas de color trazadas entre los dos cromosomas adyacentes (líneas horizontales en negro) muestran la ubicación de los genes homólogos e indican la misma orientación (rojo) u opuesta (negro) en relación con el cromosoma inmediatamente superior. Nota: El CI de L550 se alinea con los replicones del CI de cualquiera de la dos serovariedades de *L. interrogans* de forma similar al mostrado por la cepa JB197. Tomado de Bulach *et al.* (2006) <sup>[87]</sup>.

Para realizar la comparación de leptospirosis patógenas y no patógenas, fue secuenciado el genoma de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc cepa Patoc1 (cepa Ames) que consta de tres replicones con un total de 3,956,086 pb (Figura 12).

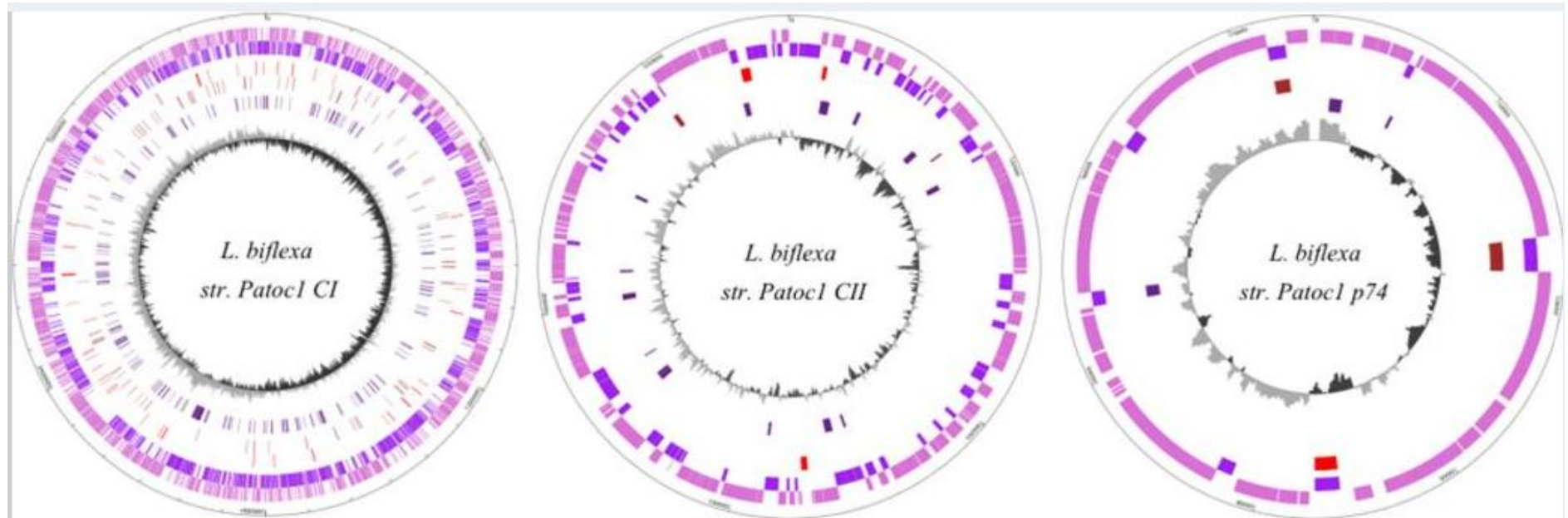


FIGURA 12: Mapa circular de los tres replicones de *L. biflexa*. 1) Inicio 0 pb. 2) rosa oscuro: genes únicos en *L. biflexa*, no encontrados en *L. interrogans* serovariedad Copenhageni y en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis. 3) púrpura oscuro: los genes que se encuentran en *L. biflexa*, *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. 4) rojo: los genes que se encuentran en *L. biflexa* y en *L. borgpetersenii*, pero no en *L. interrogans*. 5) marrón: los genes que se encuentran en *L. biflexa* y en *L. interrogans* pero no en *L. borgpetersenii*. 6) azul: genes que se encuentran en *L. biflexa* y en otras espiroquetas con genoma secuenciado (*Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Treponema denticola* y *Treponema pallidum*). 7) El anillo más interno muestra inclinación GC; sesgo positivo se muestra en gris, y el sesgo negativo se muestra en negro. Tomado de Picardeau *et al.* (2008) <sup>[1]</sup>.

Los dos cromosomas grandes tienen alta similitud con los dos cromosomas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* y por lo tanto se les nombra como cromosoma I (CI: 3,603,977 pb; GC 38.89%) y cromosoma II (CII: 277,995 pb; GC 39.27%). *Leptospira biflexa* posee un replicón circular de 74,114 pb (37.47% GC) el cual se designó como p74 y no se encuentra en las secuencias de las especies patógenas de *Leptospira*. El genoma de *Leptospira biflexa* tiene 3,590 genes codificadores de proteínas distribuidos en los tres replicones circulares, el análisis comparativo de las secuencias demuestra que 2,052 genes (61%) representan el genoma progenitor que existía antes de la divergencia de las especies de leptospiros saprófitas y patógenas. Casi un tercio de los genes de *L. biflexa* están ausentes en el genoma de leptospiros patógenas [1].

En *L. biflexa* hay limitada presencia de elementos transponibles, por el contrario, los genomas de las especies patógenas de *Leptospira* experimentaron reordenamientos frecuentes, a menudo con la recombinación por secuencias de inserción. Se han identificado genes comunes a las dos especies patógenas (*L. interrogans* y *L. borgpetersenii*) pero ausentes en *L. biflexa* lo cual es coherente debido al papel de los genes en la patogénesis de la enfermedad. Las diferencias en la capacidad de sobrevivencia en el ambiente entre *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* sugieren que la pérdida de las funciones de transducción de señales en *L. borgpetersenii* ha perjudicado su supervivencia fuera de un huésped mamífero, mientras que *L. interrogans* ha conservado funciones que facilitan la transmisión de la enfermedad a través del agua y la supervivencia en el medio [1] (Cuadro 5 y Figura 13).

CUADRO 5: COMPARACIÓN ENTRE LOS CROMOSOMAS DE *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* Y *L. biflexa*

CARACTERISTICA	<i>L. borgpetersenii</i>		<i>L. interrogans</i>		<i>L. biflexa</i>			
	CI	CII	CI	CII	CI	CII	p74	LE-1 Profago
Medida (bp)	3,614,456	317,335	4,277,185	350,181	3,603,977	277,995	74,116	73,623
Contenido G+C (%)	41.0	41.2	35.1	35.0	38.9	39.3	37.5	38.5
% Proteínas codificadas	80	80	74.9	75.5	92.3	93.3	90.9	93.4
Secuencias codificantes de Proteínas (CDS)	2,607	237	3,105	274	3,268	266	56	82
Genes con función asignada	1,644	135	1,817	159	2,042	141	31	19
Genes conservados hipotéticos	373	32	484	34	464	43	5	2
Unicamente hipotéticos	590	70	804	81	762	82	20	61
Transposasas	215	26	26	0	8	1	1	0
Pseudogenes	340	28	38	3	32	1	0	0
Genes de ARNt	37	0	37	0	35	0	0	0
Genes de ARN r								
23S	2	0	2	0	2	0	0	0
16S	2	0	2	0	2	0	0	0
5S	1	0	1	0	2	0	0	0

Modificado de Picardeau *et al.* (2008) <sup>[1]</sup>



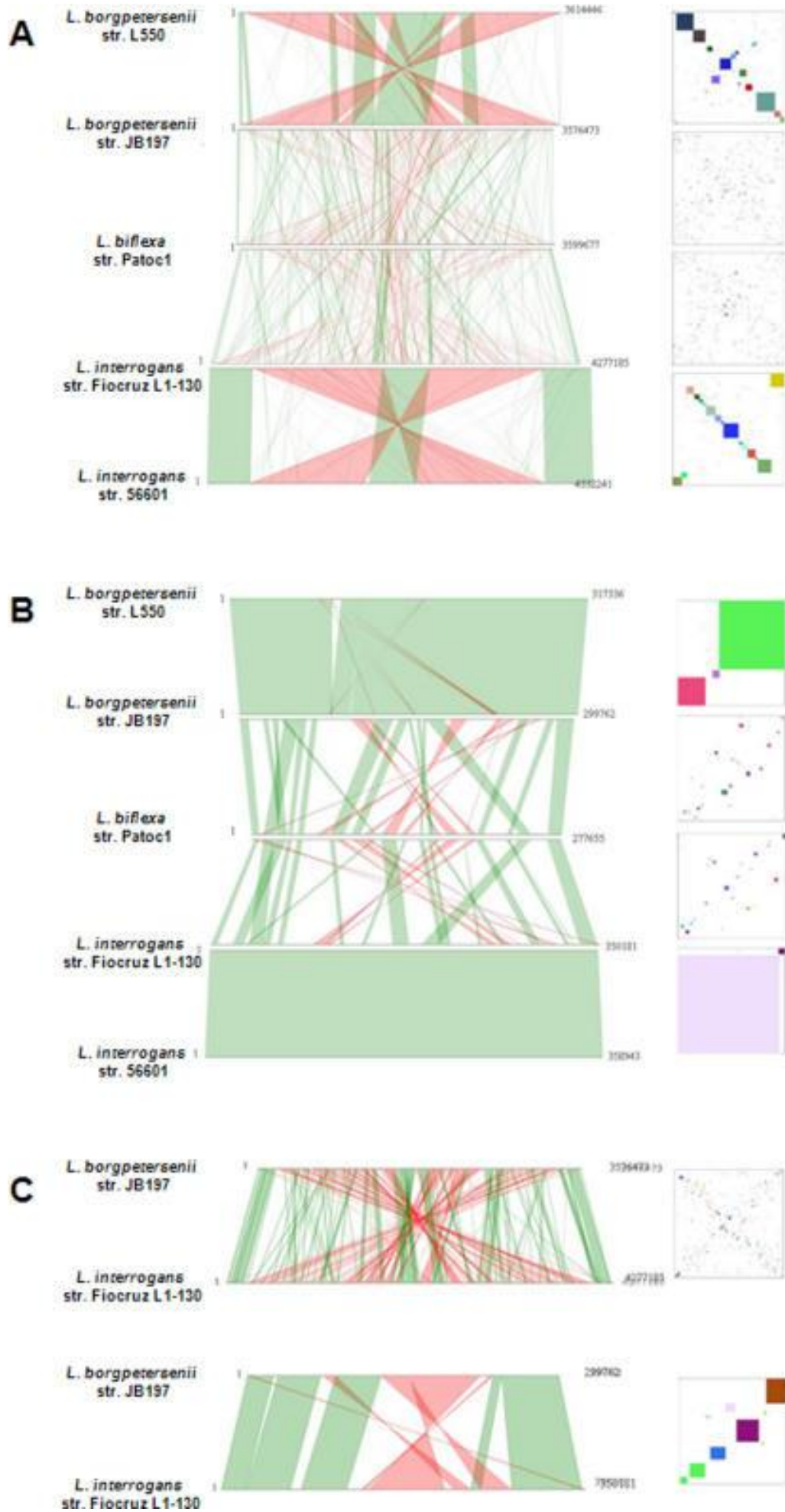


FIGURA 13: Sintenia entre los genomas de *Leptospira*. Los gráficos de líneas se obtuvieron utilizando los resultados de sintenia entre los CI (A) o los CII (B) de *L. biflexa* serovariedad Patoc, *L. interrogans* serovariedad Lai, *L. interrogans* serovariedad Copenhageni, *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepa L550, y cepa JB197. El gráfico (C) compara la sintenia entre *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepa JB197 y *L. interrogans* serovariedad Copenhageni. Para la sintenia, el tamaño mínimo de los grupos fue de cinco genes. En verde: sintenia de los grupos que se organizan en la misma cadena, en rojo: sintenia en cadenas opuestas. Tomado de Picardeau *et al.* (2008) [1].

### 1.10.2 ISLAS DE PATOGENICIDAD

El análisis por electroforesis de campos pulsados reveló un fragmento circular de ADN de 54 kb de *Leptospira interrogans* serovariedad Lai el cual no se encuentra en la serovariedad Copenhageni sugiriendo que este locus es una isla genómica, más conocida como isla genómica Lai I (LaiGI I). Esta isla genómica contiene genes que tienen una función importante como factores de virulencia y está flanqueada por supuestos *rhs* (*puntos calientes de reordenamiento*), y por una secuencia de inserción que pertenece a la familia IS4, estos componentes pertenecen a un conjunto de elementos compuestos que se encuentran en el cromosoma de *Escherichia coli* y son típicamente las secuencias codificantes (CDS) de largo con repeticiones. Entre los genes que se encuentran en esta isla existen los genes concernientes con una proteína relacionada con los miembros de las RNAsas H, esta isla de patogenicidad se ha encontrado en las serovariedades Australis, Bataviae, Canicola, Hebdomadis y Pyrogenes [88]. Su contenido de G + C difiere de la del cromosoma de la bacteria. Todas estas características se han encontrado en islas de patogenicidad de otras especies bacterianas [88].

### 1.10.3 ELEMENTO EXTRACROMOSÓMICO

De acuerdo con la secuenciación del genoma de *L. biflexa* existe una tercera estructura genética circular de 74,114 pb (37,47% GC), que se designó como p74. Este replicón no se encuentra en las secuencias de especies patógenas de *Leptospira*. Trece de los genes esenciales para la supervivencia que se encontraron en p74 se encuentran situados en el cromosoma I (CI) de leptospiros patógenas, lo que sugiere que p74 es esencial para la supervivencia de *L. biflexa*, sin embargo, no está claro si p74 funciona como un cromosoma o un elemento extracromosómico (plásmido) [1].

### 1.10.4 SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS)

Las mutaciones genéticas espontáneas se dan en forma aleatoria durante la replicación normal de la bacteria y como resultado de sus interacciones con el

medio y alteraciones en el mismo, la mayoría aparecen por errores en los procesos de replicación, reparación o recombinación del ADN <sup>[89]</sup>. La comparación de los genomas de *L. interrogans* serovariedades Lai y Copenhageni a mostrado un gran número de mutaciones puntuales entre transiciones o transversiones: también se han encontrado mutaciones por desplazamiento <sup>[85,86]</sup>.

La comparación entre *L. interrogans* y *L. borgpeterseni* demuestra la presencia de grandes deleciones y la eliminación de cientos e incluso miles de nucleótidos contiguos de genes <sup>[87]</sup>.

Varios elementos móviles de ADN se han detectado en el genoma de *Leptospira*. Las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos móviles que usualmente codifican la capacidad de catalizar su incorporación a nuevos sitios y a menudo contribuyen a la generación de reordenaciones que generan diversidad en el genoma de las células procariotas <sup>[90]</sup>.

La presencia de secuencias de inserción (IS) ha dado origen a distintos fenómenos de mutación como inversiones genéticas del material intercalado entre dos copias de la IS, cambio de orientación de un segmento de ADN, traslado de un segmento a otro lugar y translocaciones del material intercalado entre esas secuencias de inserción. Más de 40 copias de IS1533 (alrededor del 1% del genoma total) se han identificado en *L. borgpetersenii*, la presencia de IS1533 en pocas cepas y la falta de cambios en las cepas mantenidas *in vitro* sugieren que los cambios genéticos producidos por IS1533 son raros <sup>[80]</sup>. Sin embargo, existen pocos datos disponibles sobre los sitios en los que las IS se encuentran en *Leptospira*. Un análisis en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis reveló que el *loci rfb* que codifica para la biosíntesis del LPS está flanqueado por las copias de IS1533 <sup>[91]</sup>. Todos estos genes de biosíntesis de LPS se comparten con *L. interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno <sup>[42]</sup>. Por lo tanto, IS1533 puede haber jugado un papel en la transferencia lateral de estos genes. Con la secuenciación de los genomas de *L. interrogans* se detectó una nueva secuencia de inserción designada ISlin1 <sup>[86]</sup>. Se ha detectado en *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohamorrhagiae cepa Ictero No. 1 un elemento repetitivo de ADN como de



4.8 kb que contiene genes que codifican enzimas asociadas con beta-oxidación de ácidos grasos [92].

Con la secuenciación de los genomas de *Leptospira* se sabe que en el CI de la serovariedad Lai cuenta con 57 IS altamente conservadas, mientras que en la serovariedad Copenhageni sólo hay 26. El CII de la serovariedad Lai contiene nueve elementos transponibles (una copia de la IS1500, dos copias de la IS1501, y seis copias de la IS*lin1*), mientras que el CII de la serovariedad Copenhageni no tiene ninguno. Sin embargo, Copenhageni tiene cinco copias de IS1501 que se encuentran exclusivamente en el CI, mientras que la serovariedad Lai presenta tres, uno localizado en el CI y dos copias situadas en el CII [93]. La IS1500 se distribuye por igual en ambos genomas (ocho ejemplares), mientras que las IS1533 e IS1502 se encuentran en la misma ubicación en ambos genomas [94,95].

En los genomas de las serovariedades Lai y Copenhageni se confirmó la presencia de los elementos IS1500, IS1501 e IS1502 [93-95]. Un estudio realizado sobre la organización genética en *L. interrogans* sugieren que IS1500 puede ayudar a generar reordenamientos [83]. También se han detectado en *Leptospira* ISs pertenecientes a las familias IS3, IS5 y IS110 [91, 93,94].

### **1.10.5 VARIACIONES GÉNETICAS ASOCIADAS A LA TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO**

El fenómeno de transformación no ha sido documentado en forma natural en *Leptospira*. Se han realizado intentos fallidos por transformar con ADN de la cepa Shibaura de *L. interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae*, que fue resistente a la estreptomycinina y capaz de desarrollar en medio de Shenberg a 7 cepas receptoras (cinco cepas de la serovariedad *Icterohaemorrhagiae*, una cepa serovariedad Copenhageni y una cepa de la serovariedad Kremastos), pero todas tuvieron resultados negativos [96].

Tres bacteriófagos LE1, LE2 y LE3, han sido caracterizados y se limitan a la replicación en *L. biflexa* serovariedad Patoc y parecen experimentar un ciclo lítico pero no un ciclo lisogénico aunque la transducción no se ha detectado [97]. Por lo tanto, el uso de fagos para el análisis genético de *Leptospira* es limitado,

sin embargo, el desarrollo de herramientas para la manipulación genética de *Leptospira* a partir de estos fagos es posible [98].

El bacteriófago LE1 es capaz de infectar a unas pocas cepas saprófitas pero no se replica en las cepas patógenas, presenta un genoma de ADN de cadena doble de aproximadamente 74 kb y se replica como un plásmido circular. Este bacteriófago ha sido una valiosa herramienta para el desarrollo de vectores tipo “Shuttle” (pGKlep4) con resistencia a la kanamicina y que ha sido utilizado como un marcador de selección en cepas de *E. coli* y *L. biflexa* transformadas [98,99]. Dicho plásmido permitió el primer ensayo de mutagénesis dirigida en *Leptospira*, generando variantes no móviles al mutar el gen *flaB* de *L. biflexa* [50].

Hasta la fecha, no existen datos de conjugación natural en *Leptospira*, sin embargo, se ha realizado la conjugación experimental entre *E. coli* y *Leptospira* utilizando el plásmido *Himar1* (Figura 14). La transferencia de ADN se demostró por contacto célula–célula entre *L. biflexa* con *E. coli* y *L. interrogans* con *E. coli* dando transconjugates en frecuencias muy bajas que van de  $1 \times 10^{-6}$  a  $8.5 \times 10^{-8}$ . Análisis de los mutantes indica que la transposición se produce al azar en los sitios individuales del genoma de *Leptospira*, lo que permite la utilización de este sistema para generar bibliotecas de mutantes por transposones [1].

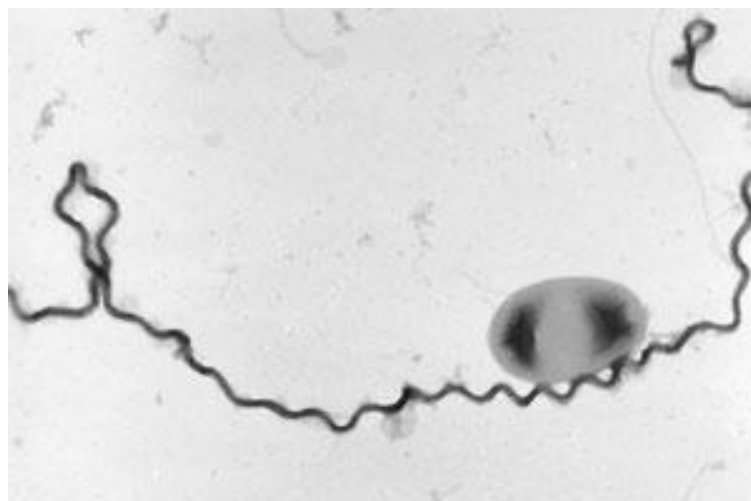


FIGURA 14: Fotografía electrónica que muestra el fenómeno de conjugación entre *E. coli* y *Leptospira biflexa*

Estos fenómenos suministran la materia prima sobre la que puede actuar la selección, de modo que las poblaciones pueden ir evolucionando con el paso del tiempo, en función de presiones ambientales.

## 1.11 LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación), a la fecha solo se han descrito siete sistemas de secreción <sup>[100]</sup>.

El sistema de secreción tipo I (T1S) es utilizado para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular <sup>[101]</sup>. Está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la membrana interna y que se denomina proteína de fusión <sup>[102,103]</sup>. Los sistemas de transporte ABC pertenecen a una superfamilia de transportadores que también son utilizados por bacterias Gram-positivas y que existen en eucariontes, desde la levadura hasta el humano, siendo los responsables del transporte de un gran número de iones y moléculas pequeñas <sup>[104]</sup>.

El sistema de secreción tipo II (T2S) es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas. Esta es la principal vía de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, el transporte a través de la membrana interna donde se transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática mediante el sistema general de secreción Sec. El poro de translocación de la vía Sec está compuesto por tres proteínas denominadas SecY, E y G, que pueden aceptar sustratos de dos diferentes fuentes. Por un

lado, la proteína precursora se mantiene en un estado de secreción competente o desplegado gracias a la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad periférica SecA (ATPasa) del complejo de translocación heterotrimérico SecYEG, en la membrana citoplásmica [105,106]. Una vez que los polipéptidos se translocan, actúa una peptidasa que procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína madura en el espacio periplásmico.

En una segunda etapa, se realiza el transporte a través de la membrana externa de la proteína que perdió su péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II (T2S) o secretón. El transporte a través de la ME está constituido por 12 a 16 proteínas accesorias, y la nomenclatura de los componentes incluye las siglas GSP del inglés (*general secretion protein*) [102, 105]. El T2S en *E. coli* incluye dos componentes en la membrana externa: la proteína GspD y la GspS. La proteína GspD, pertenece a la familia de las secretinas y está insertada en la membrana externa en forma un anillo dodecamérico. GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad [105]. La mayoría de las proteínas de este sistema (GspBCFGHIJKLMNO) se localizan en la membrana interna o en el periplasma asociadas a la membrana interna [107,108].

El sistema de secreción tipo III (T3S) requiere de más de 20 proteínas que se ensamblan en largas estructuras macromoleculares que atraviesan ambas membranas bacterianas y también la membrana plasmática eucarionte. Es a través de dichos complejos macromoleculares que ocurre el proceso de secreción. La nomenclatura utilizada para los componentes de la maquinaria de secreción incluye las siglas ysc (del inglés *Yersinia secretion*) y 11 proteínas que están conservadas en los diferentes T3S (YscCDJLNQRSTUV), de las cuales 10 comparten a su vez similitud con el aparato de exportación flagelar [109].

La mayoría de las proteínas se localizan en la membrana interna y están relacionadas con los componentes del cuerpo basal del flagelo; sólo YscN, YscQ y YscL están en el citosol o periféricos a la membrana [102, 110].

En este sistema YscN es una ATPasa altamente conservada en los diferentes T3S. Aún cuando es sec-independiente, involucra etapas que requieren al sistema Sec y la proteína YscC es la secretina ortóloga en el T2S (GspD) encargada de formar un canal en la ME.

El sistema de secreción tipo IV (T4S) secreta tanto ácidos nucleídos como proteínas. Se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Brucella suis*, entre otros [111].

El sistema modelo o prototipo para ejemplificar esta maquinaria de secreción es el del transporte de DNA oncogénico y proteínas efectoras. Este sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4, que transfieren el complejo proteína-DNA en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T. La noción general aceptada para esta vía es que no requiere de intermediarios periplásmicos, por lo que la secreción es Sec-independiente. La toxina pertussis es considerada una excepción ya que las subunidades se exportan al periplasma a través de la maquinaria Sec y su asociación en dicho compartimento celular es necesario para una secreción eficiente [112,113].

A través del sistema de secreción tipo V (T5S) se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Representa una vía Sec dependiente; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular ya que estas dirigen su propia exportación (autotransportadores). El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa [101,102].

La proteína a secretarse presenta tres diferentes regiones funcionales: una secuencia señal en el amino terminal para atravesar la membrana interna donde la señal se procesa dando lugar a un intermediario periplásmico, seguida de un dominio también llamado pasajero, que dará origen a la proteína

expuesta a la superficie celular y el dominio en el carboxilo terminal, que permite la secreción a través de la membrana externa formando una estructura de barril con 10-18 hebras antiparalelas, el dominio se inserta espontáneamente en la ME <sup>[114]</sup>, para posteriormente terminar en un plegamiento similar al que adquieren otras proteínas de la membrana externa. Para este proceso no se requiere un acoplador energético <sup>[114,115]</sup>. Una vez que la proteína se localiza en la superficie celular, el destino del dominio pasajero es diferente en los distintos organismos, puede permanecer asociado o ser liberado por proteólisis. Cabe mencionar que este sistema ha sido considerado en algunos reportes como un T4S o también se conoce como sistema de autotransportadores.

El sistema de secreción tipo VI (T6S) ha sido estudiado primariamente en el contexto de interacción patogénica entre bacteria y hospedador. Datos recientes sugieren la versatilidad del sistema de secreción con una función tal vez de promotor (comensal o mutualismo) de la relación entre bacteria y eucariotes mediante interacciones cooperativas o competitivas entre bacterias. <sup>[116]</sup>. El T6S son macromoléculas transmembranales codificadas en el genoma de la mayoría de las bacterias Gram negativas patógenas de plantas, animales y humanos incluyendo microorganismos saprófitos del suelo y del medio. El T6S esta involucrado en una amplia variedad de funciones desde la formación de película hasta la detección de estrés. Esta gran variedad de funciones se refleja en una gran diversidad de mecanismos de regulación: represión por proteínas semejantes a histonas y la regulación por detección de concentración, factores transcripcionales, sistemas de dos componentes, factores sigma alternativos o pequeños ARNs reguladores. El T6S puede estar en un estado inactivo y se activa a través de la acción de una cascada de fosforilación postraducciona. Los datos actuales revisados sugieren que las proteínas de T6S se adaptan a las necesidades específicas de las bacterias <sup>[117]</sup>.

Evidencias recientes muestran que las micobacterias han desarrollado nuevos sistemas especializados para el transporte y secreción de proteínas extracelulares a través de sus pared celular impermeable hidrofóbica llamado

sistema de secreción de tipo VII (T7S) y está implicado en la migración de la célula. Hay que considerar que pueden existir variantes presentes en diversas bacterias Gram positivas <sup>[118-121]</sup>.

### **1.11.1 LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN ENCONTRADOS EN EL GÉNERO *Leptospira***

#### **1.11.1.1 EL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I (T1S)**

El T1S es el sistema de secreción con menos componentes en *Leptospira* y consta de un transportador en la membrana citoplasmática conocida como proteína de unión al ATP (ABC). Los transportadores de la superfamilia ABC utilizan la hidrólisis de ATP para activar diversos sistemas biológicos. Consta de dos regiones conservadas: un cassette de unión al ATP (ABC) y un dominio transmembranal menos conservado (TTM). Estos se pueden encontrar en la misma proteína o en dos distintas, la mayoría de los transportadores ABC funcionan como un dímero, por lo que están constituidos por cuatro dominios, dos módulos de ABC y dos TTM <sup>[122]</sup>.

Los transportadores ABC en eubacterias están involucrados en la exportación o importación de una amplia variedad de sustratos que van desde pequeños iones hasta macromoléculas. La función principal de los sistemas de importación de ABC es proporcionar los nutrientes esenciales para la bacteria, también participan en los sistemas de secreción de sustancias nocivas, toxinas extracelulares y la focalización de los componentes de la membrana <sup>[123]</sup>.

Además consta de dos proteínas, una proteína de fusión a la membrana codificada por el gen *tolB* y una proteína de la membrana externa codificada por el gen *tolC*, que en otros microorganismos están involucrados en la secreción de proteínas como hemolisinas, carbohidratos, fármacos y metales pesados tóxicos, transportadores de aminoácidos, sistema de transporte para cinasas, proteínas transportadoras de ácidos grasos, proteínas facilitadoras para la difusión de glicerol, diferentes tipos de permeasas, proteínas acarreadoras de fosfatos, transportadores de sodio, glucosa, biopolímeros, cationes divalentes, hierro, magnesio, níquel y amonio, proteínas formadoras de poro, secretinas de la MC y componentes de sistemas de secreción Sec

independientes. Estos genes no están transcritos en el genoma de *Leptospira* [86] (Figura 15 y Cuadro 10).

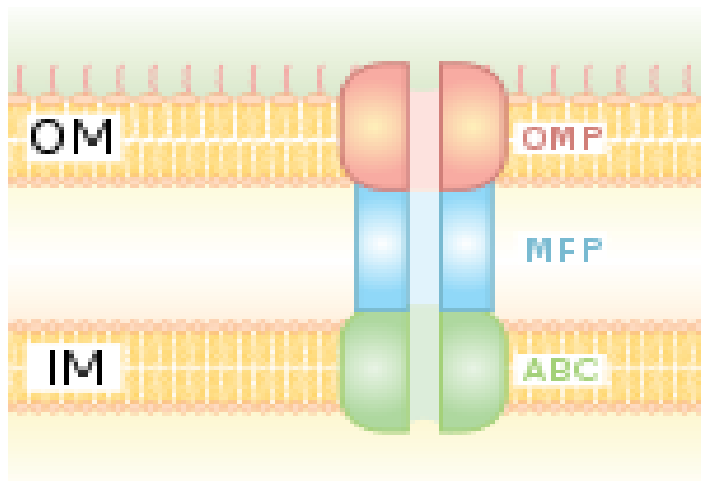


FIGURA 15: Modelo de ensamble del sistema de secreción tipo 1 (T1S) mostrando sus tres componentes.

CUADRO 6: COMPONENTES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I (T1S)

NO.	locus	FUNCIÓN	LONGITUD pb		
			<i>L. interrogans</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. biflexa</i>
1	ABC	Componente del complejo ABC - ATPasa y permeasa	1,881	1,890	1,884
		Componente del complejo ABC- dipéptido transportador	1,560	1,554	1,425
2	<i>tolB</i>	Proteína de fusión a la membrana	7,767	7,764	7,935
3	<i>tolC</i>	Proteína de la membrana externa	2,031	1,557	1,419

Modificado de Ren *et al.* (2003), Nascimento *et al.* (2004), Bulach *et al.* (2006), Picardeau *et al.* (2008) [1, 85-87].



### 1.11.1.2 EL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II (T2S)

Las primeras evidencias genéticas demostraron la presencia de genes que codifican para proteínas del sistema de transporte tipo 2 en leptospiras patógenas de *Leptospira interrogans* en las serovariedades Lai<sup>[85]</sup>, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae del serogrupo Icterohaemorrhagiae<sup>[86, 124]</sup> y recientemente en la serovariedad Canicola<sup>[125]</sup>. En todas ellas el *loci gsp* es un operón que está compuesto por 17 genes; por otro lado en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjovis está conformado por 14 genes<sup>[87]</sup> (Cuadro 7). También existen evidencias de la presencia del T2S en leptospiras no patógenas por estudios secuenciado genes de la serovariedad Patoc<sup>[1, 126]</sup> (Figura 16 y 17).

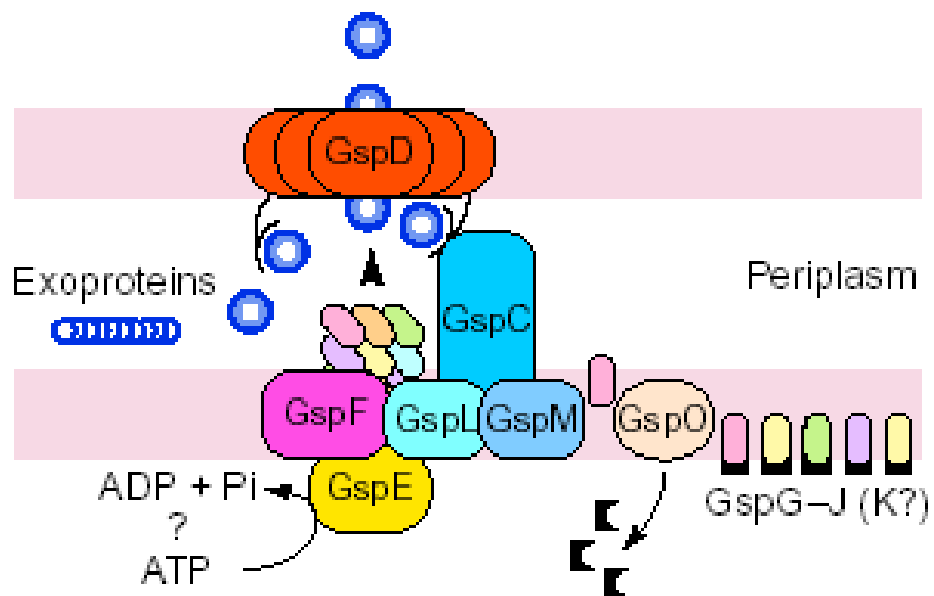


FIGURA 16: Modelo de ensamblaje del sistema de secreción tipo II (T2S) mostrando todos sus componentes.

CUADRO 7: COMPONENTES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II (T2S)  
EN *Leptospira*

NO.	locus	FUNCIÓN	LONGITUD pb		
			<i>L. interrogans</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. biflexa</i>
1	<i>gspA</i>	Lipoproteína	375	375	393
2	<i>gspB</i>	Metalopeptidasa	1,011	924	1,005
3	<i>gspC</i>	Reconocimiento de proteínas que son secretadas por este sistema y promueve el ensamblaje de pseudopilinas	909	906	915
4	<i>gspD</i>	Secretina del sistema, que forma un anillo dodecamérico	1,791	1,797	1,764
5	<i>gspE</i>	ATPasa (GspE) puede proveer la energía necesaria para la translocación o para el ensamblaje del pseudopili a través de ciclos repetitivos de unión e hidrólisis de ATP	1,674	1,674	1,677
6	<i>gspF</i>		1,227	1,227	1,227
7	<i>gspG</i>	(GspG, H, I, J y K), Son similares a las subunidades de pilina del pili tipo IV, por lo que se han denominado pseudopilinas	477	477	462
8	<i>gspH</i>		570	570	519
9	<i>gspI</i>		537	630	462
10	<i>gspJ</i>		645	645	672
11	<i>gspK</i>		1,176	1,227	1,044
12	<i>gspL</i>	Energiza el proceso, se localiza en el citoplasma e interactúa con la ATPasa GspE	1,623	1,626	1,623
13	<i>gspM</i>	Proteína hipotética, su función no es conocida, aunque está en el periplasma	528	528	525
14	<i>gspN</i>	Proteína hipotética, su función no es conocida aunque está en el periplasma	942	927	963
15	<i>gspO</i>	Procesa la secuencia señal de las prepilinas para ser exportada al periplasma.	744	-----	-----
16	<i>gspP</i>		228	-----	-----
17	<i>gspQ</i>		267	-----	-----
18	<i>gspS</i>	Lipoproteína de la ME que da soporte y actúa como chaperona para GspD, contribuyendo a su correcto plegamiento y actividad, protege a la secretina contra degradación proteolítica	No se encontró en los genomas	-----	-----

Modificado de Ren *et al.* (2003), Nascimento *et al.* (2004), Bulach *et al.* (2006), Picardeau *et al.* (2008) <sup>[1, 85-87]</sup>.

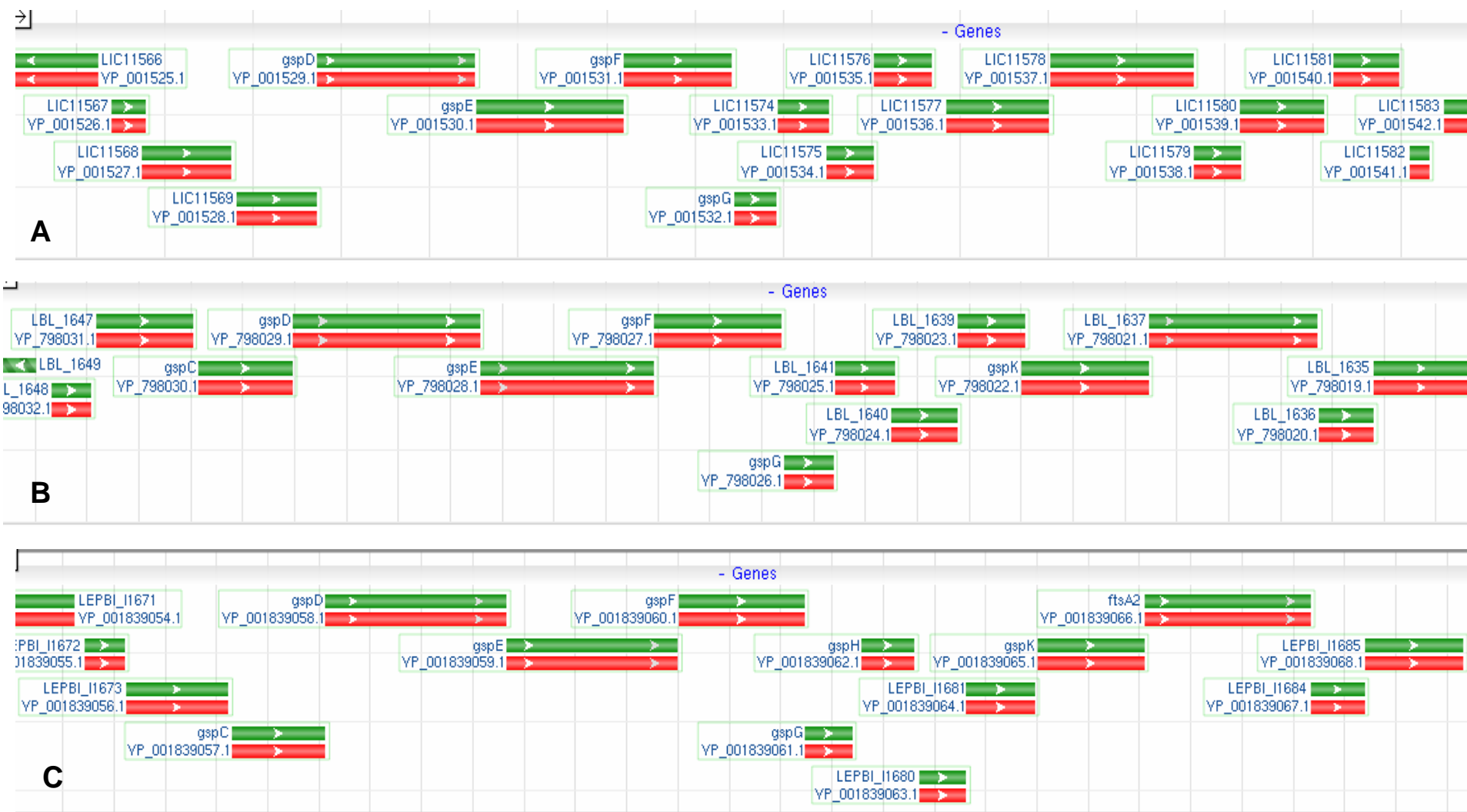


FIGURA 17: Representación esquemática de los *loci gsp* de diferentes especies de *Leptospira*. (A) *gsp* en *L. interrogans* consta de 17 marcos abiertos de lectura, *L. borgpetersenii* (B) y *L. biflexa* (C) tiene 14 marcos abiertos de lectura, estas especies son carentes de los tres últimos genes.

### 1.11.2 *gspD* SU PRESENCIA EN EL GÉNERO *Leptospira*

En los últimos años, con el estudio de los componentes de la membrana externa de *Leptospira* ha dado pie al descubrimiento del T2S compuesto por 17 marcos abiertos de lectura que codifican para 17 proteínas, una de las cuales codifica para una secretina de 66.3 kD conocida como GspD por la que *Leptospira* potencialmente exterioriza enzimas y toxinas <sup>[127]</sup>

Estudios de secuenciación de *gspD* han demostrado que se encuentra tanto en leptospiros no patógenos (serovariedad Patoc) donde su longitud es de 1,788 pb <sup>[1, 126]</sup>, como en leptospiros patógenos donde en Copenhageni la longitud es de 1,791 pb <sup>[86]</sup>; en Hardjobovis es de 1,794 pb <sup>[87]</sup> y en Lai de 1,848 pb <sup>[85]</sup>; dentro de las serovariedades patógenas hay una similitud de un 83 a 99 % y de 59% con la serovariedad Patoc <sup>[126]</sup>. GspD es una proteína homóloga de otras secretinas encontradas en diferentes géneros bacterianos (Figura 18). Actualmente, se tienen indicios de que la proteína GspD es la secretina que se encuentra anclada a la membrana externa de *Leptospira* y que es expresada in vitro e in vivo en tejidos de animales y que es inmunogénica <sup>[127,128]</sup>

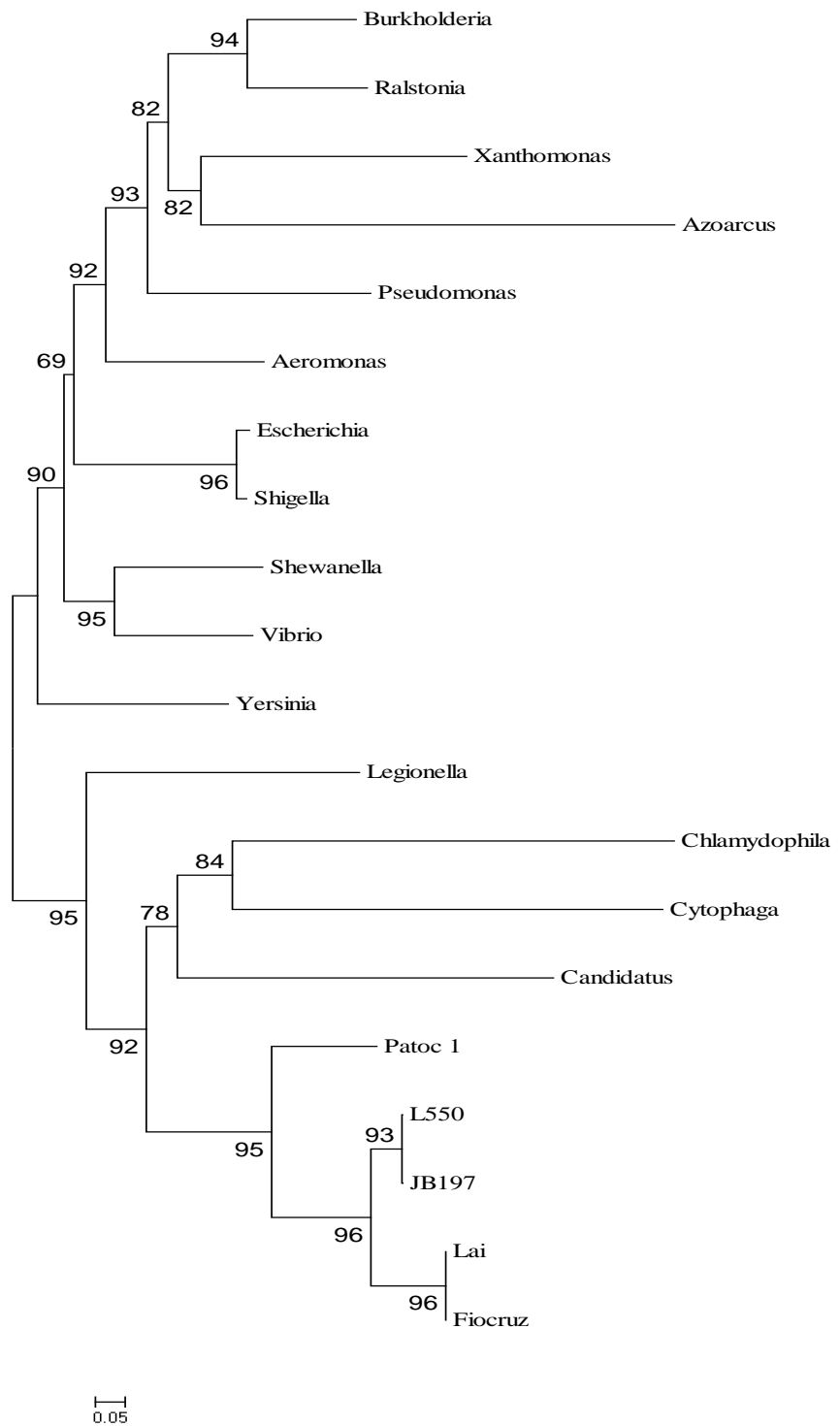


FIGURA 18: Árbol filogenético basado en las secuencias de *gspD* de cinco serovariedades de *Leptospira* y 15 géneros de bacterias Gram negativas

## **1.12 DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS Y CARACTERIZACIÓN DE LEPTOSPIRAS**

La signología clínica de la leptospirosis en la mayoría de los casos es muy variable y no es representativa de la enfermedad, por tal razón el diagnóstico definitivo no se puede realizar sin confirmación del laboratorio y por consiguiente, los procedimientos de laboratorio son herramientas muy importantes en el diagnóstico temprano de leptospirosis. Las técnicas más comunes que se utilizan para el diagnóstico incluyen, pruebas serológicas, examen microscópico de campo oscuro, inmunofluorescencia y técnicas de biología molecular. El aislamiento del microorganismo e inoculación de muestras clínicas en animales de laboratorio debe ser utilizado para confirmar la infección y con fines de tipo epidemiológico <sup>[129]</sup>.

### **1.12.1 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO**

El diagnóstico definitivo de leptospirosis se realiza mediante el aislamiento en medios de cultivo artificiales, los aislamientos también son necesarios para la tipificación, como antígenos específicos en las pruebas serológicas y para la determinación de la patogenicidad <sup>[130,131]</sup>. El órgano blanco de *Leptospira* es el riñón, por lo que pueden ser aisladas a partir de orina y riñones de animales infectados (fase de leptospiuria), pero también se pueden considerar otros tejidos (hígado) y fluidos (líquido ascítico, cerebrospinal y contenido abomasal de fetos) como posibles fuentes para el aislamiento (fase de leptospiremia) <sup>[132]</sup>. La principal ventaja del cultivo bacteriológico es que las leptospiros de cualquier serovariedad pueden ser potencialmente aisladas y posteriormente identificadas, sin embargo, los procedimientos bacteriológicos de cultivo son caros, lentos y poco eficaces para ser aplicados rutinariamente, ya que en muestras clínicas son necesarias incubaciones de 4 a 6 meses para obtener resultados concluyentes <sup>[133]</sup>. Para realizar la selección de las muestras que se utilizarán para el aislamiento, es importante determinar primero la etapa de la enfermedad, en los casos de enfermedad aguda, el aislamiento debe intentarse a partir de muestras de sangre (leptospiremia), mientras que la fase crónica, después del desarrollo de la respuesta inmunológica, el aislamiento se debe

intentar a partir de orina. En el caso de presentarse la enfermedad clínica y muerte del animal o con fetos abortados, el aislamiento se debe intentar de riñón, hígado, humor acuoso y contenido estomacal (abomasal en rumiantes) <sup>[131]</sup>. El cultivo del microorganismo a partir de muestras clínicas también se puede realizar mediante la inyección por vía intraperitoneal de macerados de muestras frescas directamente en hámsteres o cuyos, los animales se observan diariamente para poder detectar signos de infección <sup>[134]</sup>.

### **1.12.2 MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO (CO)**

El examen microscópico por campo oscuro de la orina centrifugada se ha considerado como una prueba de diagnóstico rápida, sin embargo, la observación de la muestra por CO no es sensible y requiere de un observador experto para diferenciar leptospiras de artefactos <sup>[133]</sup>. Para la caracterización de aislados, el campo oscuro solo puede llegar hasta la identificación de la familia Leptospiraceae, ya que no se puede diferenciar entre los géneros *Leptospira*, *Turneriella* y *Leptonema* <sup>[3]</sup>.

### **1.12.3 PRUEBAS SEROLÓGICAS**

El diagnóstico de la leptospirosis tanto para animales como para el humano se basa principalmente en pruebas serológicas, sin embargo, estas pruebas no diferencian entre los títulos obtenidos por vacunación o por una infección de campo, en humanos el uso de la vacunación para prevenir la enfermedad se ha aplicado en algunos países como Cuba, China, Rusia <sup>[6]</sup>.

#### **1.12.3.1 AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA (AM) Y CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE AISLADOS (SEROTIPIFICACIÓN)**

La prueba de aglutinación microscópica (AM) fue descrita originalmente en 1965 <sup>[135]</sup> y posteriormente fue modificada por Cole JR Jr (1973) <sup>[136]</sup>, actualmente es la prueba de referencia a nivel internacional para realizar el diagnóstico serológico de leptospirosis <sup>[6]</sup>.

La prueba de AM tiene como fundamento las diferencias antigénicas del LPS de las diferentes SVs de *Leptospira*, como desventajas se puede mencionar que es laboriosa <sup>[137]</sup> y que no diferencia entre los títulos obtenidos después de la vacunación y los títulos por infección natural, así mismo, el uso de cultivos vivos de leptospiros patógenos implica un riesgo de infección al hombre <sup>[138]</sup>.

Antes de la genotipificación, la serotipificación era el único método de clasificación que utilizaban los laboratorios especializados en leptospirosis, la serotipificación consiste en subdividir al género *Leptospira* en diversas serovariedades según los caracteres de sus aglutinógenos, determinados por reacciones de aglutinación y de adsorción cruzada mediante sueros inmunes producidos en conejo. Con base en los acuerdos del subcomité de leptospiros de la Comisión Internacional de Nomenclatura Bacteriológica en el sexto Congreso Internacional de Microbiología celebrado en 1953, se consideró que dos cepas pertenecen a serovariedades distintas si, después de la adsorción cruzada con cantidades adecuadas de antígeno heterólogo, el antisuero de cada cepa conserva regularmente el 10% o más del título obtenido en la cepa homóloga <sup>[139]</sup>.

Por las características genéticas del microorganismo la aglutinación adsorción cruzada ha sido considerada el método de referencia para la identificación de la serovariedad, pero es incapaz de distinguir diferencias entre serovariedades presentes en diferentes especies de *Leptospira* como *Grippityphosa*, *Hardjo* o *Canicola* <sup>[44, 139]</sup>.

Aunado a esto, la reproducibilidad del método serológico no es satisfactoria, además de ser laborioso y tardado. En 1967 Kmety propuso el sistema antigénico para ser usado en la taxonomía de leptospiros, este método fue una mejora considerable en el sistema de clasificación, sin embargo, variaciones en los lotes de suero inmune llevan a la falta de reproducibilidad de la técnica, junto con la premisa de que una gran cantidad de serovariedades no pueden ser identificadas <sup>[140]</sup>. Por ejemplo, en el serogrupo Sejroe, no es posible demostrar las diferencias antigénicas entre las serovariedades *Hardjobovis* y *Hardjoprajitno*. Otro inconveniente de la clasificación por serovariedad es la falta de relación directa con manifestaciones clínicas, distribución geográfica u



otros marcadores epidemiológicos. Por tal razón, como alternativa a la serología se han explorado otras técnicas basadas en el ADN para la caracterización de leptospiras <sup>[141]</sup>

### **1.12.3.2 ENZAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Esta prueba es muy sensible, fácil de realizar y puede medir los niveles de anticuerpos de las clases IgM e IgG en suero sin fraccionamiento previo, mediante el uso de anticuerpos específicos anti-IgM y anti-IgG <sup>[142]</sup>. Tiene una serie de ventajas con respecto a la prueba de aglutinación microscópica ya que utiliza antígeno inactivado y los resultados se pueden leer objetivamente <sup>[137]</sup>. La prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* se ha desarrollado utilizando antígenos de superficie como las lipoproteínas LipL32 <sup>[143,144]</sup>, LipL41 <sup>[145]</sup> y OmpL1 <sup>[146]</sup>, hasta células completas existiendo protocolos para realizar la prueba en placas y tiras reactivas. En general, las pruebas de ELISA son muy sensibles ya que los anticuerpos anti-IgM se pueden detectar desde la primera semana después de la infección, aún antes de que los anticuerpos aglutinantes estén presentes, sin embargo, la prueba carece de especificidad para determinar la serovariedad <sup>[147]</sup>.

### **1.12.3.3 FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO**

La fijación del complemento puede ser una prueba útil en la detección de la infección activa por leptospirosis, así mismo, puede ser utilizada para detectar sueros positivos antes de realizar la prueba de aglutinación microscópica <sup>[148]</sup>. Esta técnica tiene la desventaja de que es mucho menos sensible que la aglutinación microscópica y no puede detectar niveles bajos de anticuerpos <sup>[149]</sup>.

### **1.12.3.4 AGLUTINACIÓN EN MICROCÁPSULA (MCAT)**

La aglutinación en microcápsula es una técnica que se presentó como posible opción a las utilizadas habitualmente. En ella, se utiliza antígeno de leptospiras

transportado en microcápsulas de un polímero sintético. Se ha mencionado que la técnica de MCAT es una prueba muy específica y sensible, ya que es más reactiva a los anticuerpos IgM en comparación con la prueba de aglutinación microscópica (AM) y es superior en la detección de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad [150-151].

### **1.12.3.5 INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

La prueba de inmunofluorescencia es muy útil para la demostración de leptospiras en tejidos de animales que han muerto de leptospirosis (incluyendo fetos) [152]. En un estudio realizado en 1966 se reportó que la prueba de IF fue superior a los métodos de cultivo bacteriológico e histopatología en la demostración de la presencia de leptospiras en muestras autolisadas [153] y aplicada a muestras de orina y cultivos es un método de diagnóstico rápido y preciso para detectar la presencia de leptospiras y para la identificación de serovariedades [154]. Así mismo, se puede utilizar con tejidos frescos o congelados y en caso de orina ayuda en la discriminación de leptospiras de artefactos [155].

### **1.12.3.6 INMUNOHISTOQUÍMICA**

La inmunohistoquímica (IHQ) combina elementos inmunológicos, histológicos y bioquímicos, esta técnica permite detectar un antígeno y ubicarlo histológicamente en una muestra determinada, a diferencia de la inmunofluorescencia. La IHQ se ha utilizado en el diagnóstico de diversas enfermedades de muy distintas etiologías, así como en estudios de biología celular [128]. También se ha descrito su aplicación para diagnóstico de leptospirosis por lo que sería posible utilizar esta técnica para detectar antígenos de *Leptospira* en muestras de animales donde se sospecha de leptospirosis [18].

### **1.12.3.7 HEMOAGLUTINACIÓN (HAI)**

La hemoaglutinación pasiva o hemoaglutinación indirecta (HAI) es una técnica útil, sencilla y no requiere de ningún equipo especializado, esta prueba puede determinar la infección reciente en los casos de leptospirosis en la cual se ha observado una sensibilidad del 92 % y una especificidad de 95 %, detectándose anticuerpos del tipo IgM, lo que permite el diagnóstico de las infecciones recientes, su utilidad se reduce a solo dar información del género. En esta técnica se utilizan eritrocitos de carnero sensibilizados con una cepa de *Leptospira*, que por lo general son cepas no patógenas <sup>[156]</sup>. La HAI unida a la información clínica y epidemiológica ha sido de vital importancia para el control de la enfermedad en el hombre. Una estrategia semejante pudiera ser efectiva en animales domésticos. Esta técnica de diagnóstico ha sido muy bien estandarizada y validada. Entre los inconvenientes se encuentran la reactividad positiva por la presencia de especies no patógenas en la especie animal <sup>[157]</sup>.

### **1.12.4 ESTUDIOS PATOLÓGICOS**

A pesar del gran volumen de literatura que se ha escrito sobre las descripciones clásicas de la patología post-mortem de la leptospirosis, las lesiones no son características de la enfermedad y los casos clásicos son la excepción a la regla <sup>[158,159]</sup>.

Las lesiones más frecuentes se observan en los riñones, donde la necrosis cortical celular, petequias y hemorragias equimóticas ocurren especialmente en los glomérulos y los túbulos contorneados proximales. Sin embargo, el alcance y la gravedad de las lesiones dependen de la serovariedad infectante, la edad del animal y el estadio de la enfermedad <sup>[37]</sup>.

Las principales lesiones patológicas que pueden observarse en forma aguda, son anemia, ictericia, hemoglobinuria y hemorragias. En los animales recuperados de la forma aguda de la enfermedad el hallazgo característico es la nefritis intersticial progresiva. En el caso de aborto en la placenta se puede observar edema y placentitis, en el feto se puede detectar nefritis <sup>[26]</sup>.

### **1.12.5 PRUEBAS MOLECULARES**

Para entender la epidemiología cambiante de la enfermedad es esencial conocer la identidad de las cepas hasta su serovariedad y sin embargo, pocos laboratorios poseen los recursos para realizar la identificación serológica tradicional. Con los casos de bioterrorismo, aumentaron los problemas en trámites de importación y exportación de biológicos, siendo este un proceso tardado. Por lo tanto, la mayoría de los aislados no se identifican plenamente. Varios métodos moleculares basados en patrones electroforéticos y en secuenciación de ADN se han aplicado para realizar la identificación de leptospiras <sup>[129, 160, 161]</sup>.

#### **1.12.5.1 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La hibridación con sondas de ADN genómico se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico rápido, específico y sensible de muchas enfermedades infecciosas, entre ellas la leptospirosis <sup>[162-164]</sup>.

La detección de leptospiras en muestras clínicas utilizando una sonda de ADN fue descrita por primera vez en 1987 por Terpstra y colaboradores para detectar *L. interrogans* en muestras de sangre, hígado y orina, no detectando hibridación cruzada con otras bacterias <sup>[162]</sup>. LeFebvre en el mismo año describió una sonda de ADN que permitía identificar el subtipo Hardjobovis en ganado <sup>[165]</sup>. Más tarde, Zuerner y Bolin en 1988 clonaron una secuencia de ADN repetitivo de Hardjobovis encontrando que la técnica de hibridación de ADN es sensible y específica para el diagnóstico de leptospirosis causada por el subtipo Hardjobovis <sup>[166]</sup>. Así mismo, en un estudio comparativo se mostró que la hibridación de ADN fue más sensible que la prueba de inmunofluorescencia (IF) y las técnicas de cultivo para el diagnóstico de la leptospirosis bovina <sup>[133]</sup>.

#### **1.12.5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La técnica de PCR es una prueba rápida y sensible para el diagnóstico de leptospirosis <sup>[167]</sup>. Varios han sido los investigadores que han aplicado esta técnica a muestras clínicas, en 1989 se desarrolló un ensayo de PCR donde se

podieron detectar 10 microorganismos del subtipo Hardjobovis en muestras de orina de bovino <sup>[167]</sup>. También se han descrito protocolos para preparar muestras de orina de la especie bovina con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba de PCR <sup>[168]</sup>. Actualmente la técnica de PCR se utiliza en laboratorios de diagnóstico para la detección de leptospiras en tejidos y fluidos corporales de animales y humanos. Una variedad de oligonucleótidos para realizar la PCR se han diseñado para identificar no sólo el género *Leptospira*, también especies patógenas y en algunos casos la serovariedad <sup>[169]</sup>.

### **1.12.5.3 POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)**

La técnica de RFLP ha sido empleada para clasificar e identificar leptospiras, incluidas cepas que son serológicamente indistinguibles <sup>[168, 170, 171]</sup>. La identificación de serovariedades de *Leptospira interrogans* por RFLP fue descrita por primera vez en 1981 <sup>[172]</sup>, estudios posteriores han confirmado la utilidad de la técnica como una forma de identificar serovariedades de *Leptospira* y ha encontrado diferencias entre los genotipos aislados de campo y las cepas de referencia, así como ha permitido la diferenciación entre serovariedades estrechamente relacionadas <sup>[171]</sup>.

En esta técnica, un gran número de fragmentos se generan después de la restricción con una enzima endonucleasa como *EcoRI*, *HhaI* o *HindIII* posteriormente los fragmentos son visualizados con tinciones de plata en geles de poliacrilamida (PAG) o en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Sin embargo, se menciona que hay una mejor resolución de los fragmentos teñidos con plata en comparación con el bromuro de etidio <sup>[142, 173, 174]</sup>.

### **1.12.5.4 ELECTROFORESIS EN GEL CON CAMPOS PULSADOS (PFGE)**

La PFGE ha sido ampliamente utilizada para caracterizar células eucariotas superiores, incluidos los seres humanos. También se ha empleado para estudios filogenéticos y epidemiológicos de bacterias patógenas. La técnica de PFGE es un método alternativo para la identificación de serovariedades de

*Leptospira* y tiene la capacidad de diferenciar entre las cepas de las serovariedades que pertenecen a especies diferentes, también es apta para resaltar rápidamente aislados que pueden representar nuevas especies o serovariedades, por lo que es una herramienta muy útil para los propósitos taxonómicos. Se ha utilizado en la identificación del serovariedades aisladas obtenidas de animales y del hombre [44, 173, 175] (Figura 19).

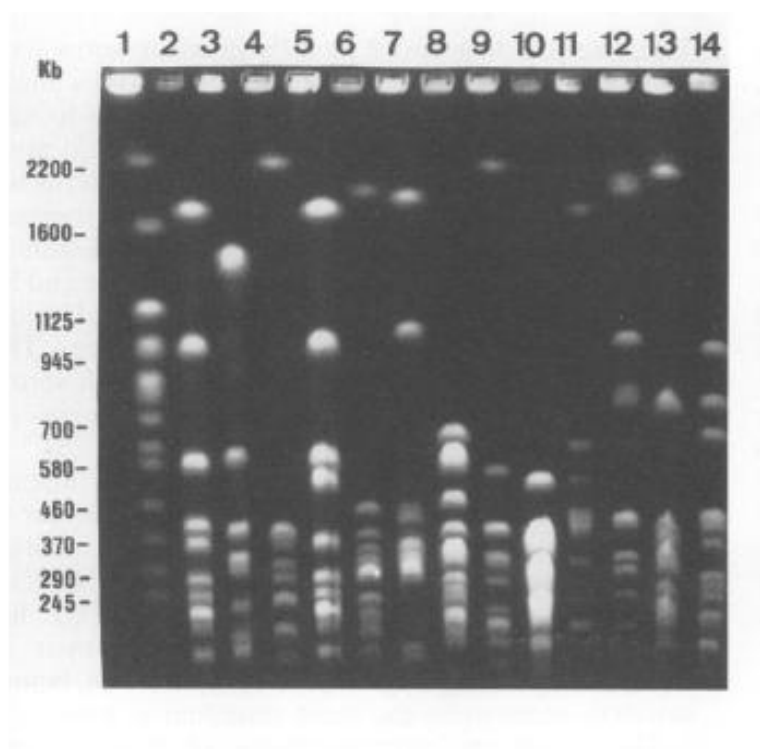


FIGURA 19: PFGE de serovariedades del serogrupo Canicola cortadas con *NotI*. Carriles: 1:marcador de peso molecular y del 2 al 14 serovariedades Canicola, Bindjei, Malaya, Portlandvere, Sumneri, Jonsis, Bafani, Benjamini, Galtoni, Schueffneri, Broomi, Kuwait y Kamituga. Tomado de Herrmann *et al.* (1992) [173].

Por tener como base la relación de patrones de bandeo, la PFGE de *Leptospira* ha tenido uso limitado en algunos laboratorios, ya que dificulta la comparación de datos y requiere ser optimizado con una segunda enzima para diferenciar entre algunas serovariedades que están muy relacionadas [44, 173] (Cuadro 8).

CUADRO 8: SEROVARIEDADES DE *Leptospira* INDISTINGUIBLES O ESTRECHAMENTE RELACIONADAS POR ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS

SEROVARIEDADES COMPARADAS	ESPECIES	NO. DE FRAGMENTOS DIFERENTES
Bataviae (cepa Van Tienen), 26–73	<i>L. interrogans</i>	0
Kennewicki/Pomona (cepa 164), Guaratuba	<i>L. interrogans</i>	0
Pinchang, Sichuan	Genomospecies 1	0
Lyme, Kaup	<i>L. inadai</i>	0
Aguaruna, Valbuzzi	<i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>	0
Castellonis, Ballum (cepa S102)	<i>L. borgpetersenii</i>	0
Icterohaemorrhagiae, Copenhageni	<i>L. interrogans</i>	1
Roumanica, Wolffi	<i>L. interrogans</i>	2
Panama, Pomona (cepa 24K)	<i>L. noguchii</i>	2
Georgia, Szwajizak (cepa Oregon)	<i>L. santarosai</i>	2
Lyme/Kaup y Aguaruna/Valbuzzi	<i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>	2
Yunxian, Qunjisn	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i>	2
Bratislava, Lora	<i>L. interrogans</i>	2

Tomado de Herrmann *et al.* (1992) <sup>[173]</sup>.

#### 1.12.5.5 DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)

Es una técnica desarrollada en el año 1990 donde se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar en el genoma. La secuencia corta y la baja temperatura de alineamiento (36°C) favorecen que los decanucleótidos se unan con infinidad a secuencias en el genoma para amplificar muchos fragmentos de DNA. Los fragmentos separados en geles de agarosa muestran perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de

individuos. La RAPD utilizada en la diferenciación de cepas de *Leptospira* puede dar patrones de bandas diferentes, consistentes y reproducibles para cada cepa. [129, 176-180] (Figura 20).

La técnica de RAPD es una herramienta potencialmente útil en el seguimiento de brotes de leptospirosis, ayudando a la rápida identificación de las cepas, lo cual es un proceso necesario para las estrategias de control, esta técnica de RAPD es muy cómoda, rápida, requiere poco DNA que además no necesita estar muy puro, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia y se pueden distinguir rápida y simultáneamente entre muchos organismos. Sin embargo, también existe la desventaja de la incapacidad para distinguir entre miembros muy relacionados genéticamente por ejemplo; serovariedades del serogrupo Australis, Jalna, Bratislava y Lora, así como la incapacidad de distinguir entre las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni del serogrupo Icterohaemorrhagiae, no obstante el uso de otros decanucleótidos puede resolver este problema [181].

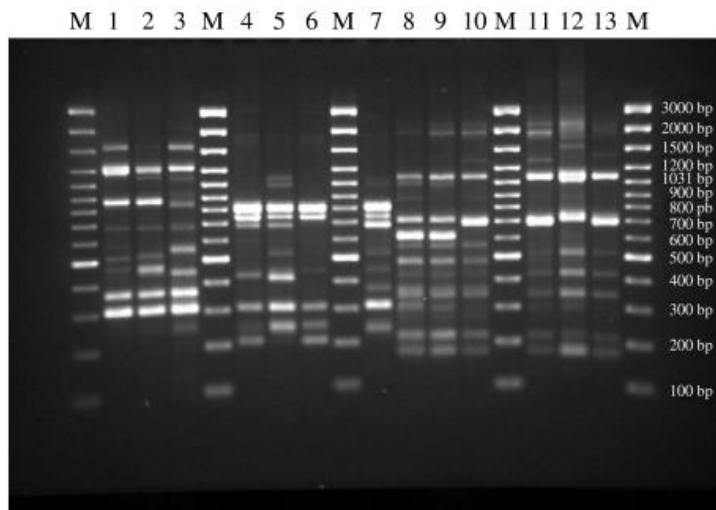


FIGURA 20: RAPD de serovariedades de leptospirosis. Línea M) marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1) Serovariedad Pomona cepa Pomona; carril 2) Serovariedad Lora cepa Lora; carril 3) Serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA; carril 4) Serovariedad no probada cepa Vajany; carril 5) Serovariedad Mozdok cepa 5621; carril 6) Serovariedad Djatzi cepa HS 26; carril 7) Serovariedad Grippytyphosa cepa Moskva V; carril 8) Serovariedad Sejroe cepa M84; carril 9) Serovariedad Istrica cepa Bratislava; carril 10) Serovariedad Polonica cepa 493 Polonia; carril 11) Serovariedad Saxkoebing cepa Mus 24; carril 12) Serovariedad Sorexjalna cepa Sorex Jalna; carril 13) Serovariedad Arborea cepa Arborea. Tomado de Resch *et al.* (2007) [181].



### 1.12.5.6 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS FLUORESCENTES (FAFLP)

La técnica de FAFLP se basa en la amplificación por PCR de los fragmentos de restricción del el ADN genómico digerido. La técnica consiste en tres pasos:

- A) La restricción del ADN y ligación de adaptadores oligonucleótidos.
- B) La amplificación selectiva de los conjuntos de fragmentos de restricción.
- C) Análisis del gel de los fragmentos amplificados.

El método permite la co-amplificación específica de un elevado número de fragmentos de restricción. El número de fragmentos que pueden ser analizados al mismo tiempo, sin embargo, depende de la resolución del sistema de detección. Por lo general 50 a 100 fragmentos de restricción se amplifican y se detectan en geles de poliacrilamida desnaturalizante. La FAFLP proporciona una nueva y poderosa técnica para la toma de huellas dactilares de ADN de cualquier origen o complejidad <sup>[182]</sup> (Figura 21).

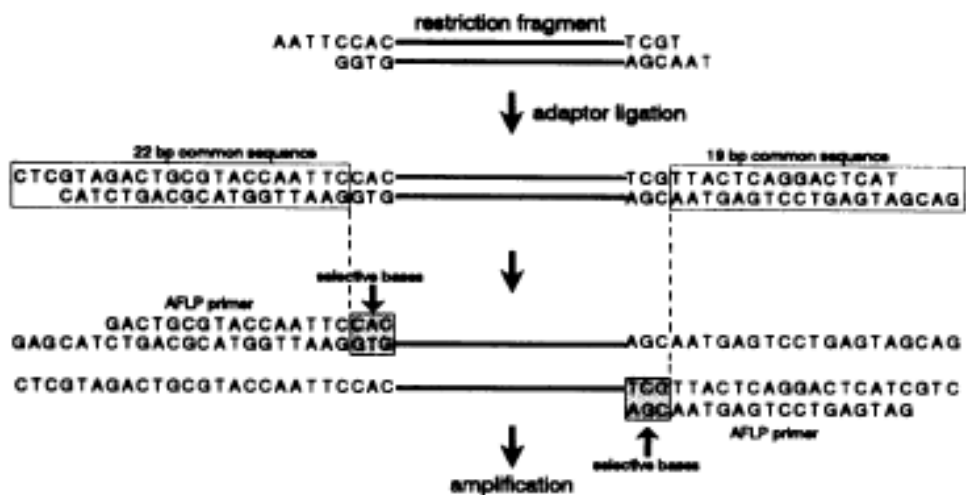


FIGURA 21: Representación esquemática de la técnica de FAFLP. Arriba: fragmento de restricción *EcoRI-MseI* con terminaciones coesivas en 5'. Centro: el mismo fragmento después de la ligadura de los adaptadores *EcoRI* y *MseI*. Abajo: las dos hebras del fragmento con sus correspondientes iniciadores. El extremo 3' de los iniciadores y su secuencia de reconocimiento en el fragmento *EcoRI-MseI* se destacan. Tomado de Vos *et al.* (1995) <sup>[182]</sup>.

Esta técnica se ha utilizado eficazmente para estudiar el registro epidemiológico de algunas enfermedades infecciosas y para entender la evolución de los patógenos <sup>[183-185]</sup>.

Se ha analizado la relación filogenética entre los aislados de leptospiras recuperados a partir de brotes grandes y de varios casos esporádicos con el objetivo de entender la distribución y evolución de este microorganismo y así mismo, estudiar la asociación entre la naturaleza genética de las cepas que infectan y la presentación clínica de los casos. Los perfiles generados (con disposición electrónica) pueden ser útiles para las comparaciones entre laboratorios y para el almacenamiento en bases de datos clínico-epidemiológica <sup>[129]</sup>.

#### **1.12.5.7 NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (VNTRs)**

El genoma de *Leptospira* además de tener ISs también contiene abundantes secuencias repetitivas de ADN. Entre estas repeticiones de ADN, las repeticiones en tándem de secuencias cortas son típicas. Las repeticiones en tándem consisten en secuencias de 10 a 100 pb que se repiten en el genoma. El estudio del número de repeticiones en tándem y el polimorfismo de cada una es llamado Número Variable de Repeticiones en Tandem (VNTRs) y recientemente, el uso de VNTRs igualmente se ha descrito para estudios filogenéticos y epidemiológicos de bacterias patógenas. Este método es rápido y fácil y contribuye en gran medida a un mejor conocimiento de la epidemiología de *Leptospira* <sup>[161, 186]</sup>.

En comparación con otras bacterias, *Leptospira* presenta un alto número de repeticiones en tándem con una longitud total superior a 100 pb (27 y 29 por Mb para las cepas Fiocruz y Lai, respectivamente). La comparación genómica entre las serovariedades Lai y Copenhageni mostró que existen 131 loci VNTR, con un largo de secuencia repetitiva de entre 5 y 500 pb <sup>[85,86,187]</sup>. En *L. interrogans*, 40 secuencias de VNTRs fueron analizadas de las cuales, los siete loci VNTR más discriminativos fueron, VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR11, VNTR19 (Figura 22) y VNTR23, estos proporcionan suficiente

robustes para la identificación de serovariedades, estudios de epidemiología y filogenéticos en *L. interrogans*.

Al igual que la PFGE, la técnica de VNTR no fue capaz de discriminar entre las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni de *L. interrogans*, tampoco entre las serovariedades Bratislava y Australis del serogrupo Australis de *L. interrogans*, sin embargo, las dos serovariedades fueron diferenciadas por PFGE <sup>[173]</sup>, como sucede con las serovariedades Roumanica y Wolffi del serogrupo Serjoe <sup>[161]</sup> (Figura 23).

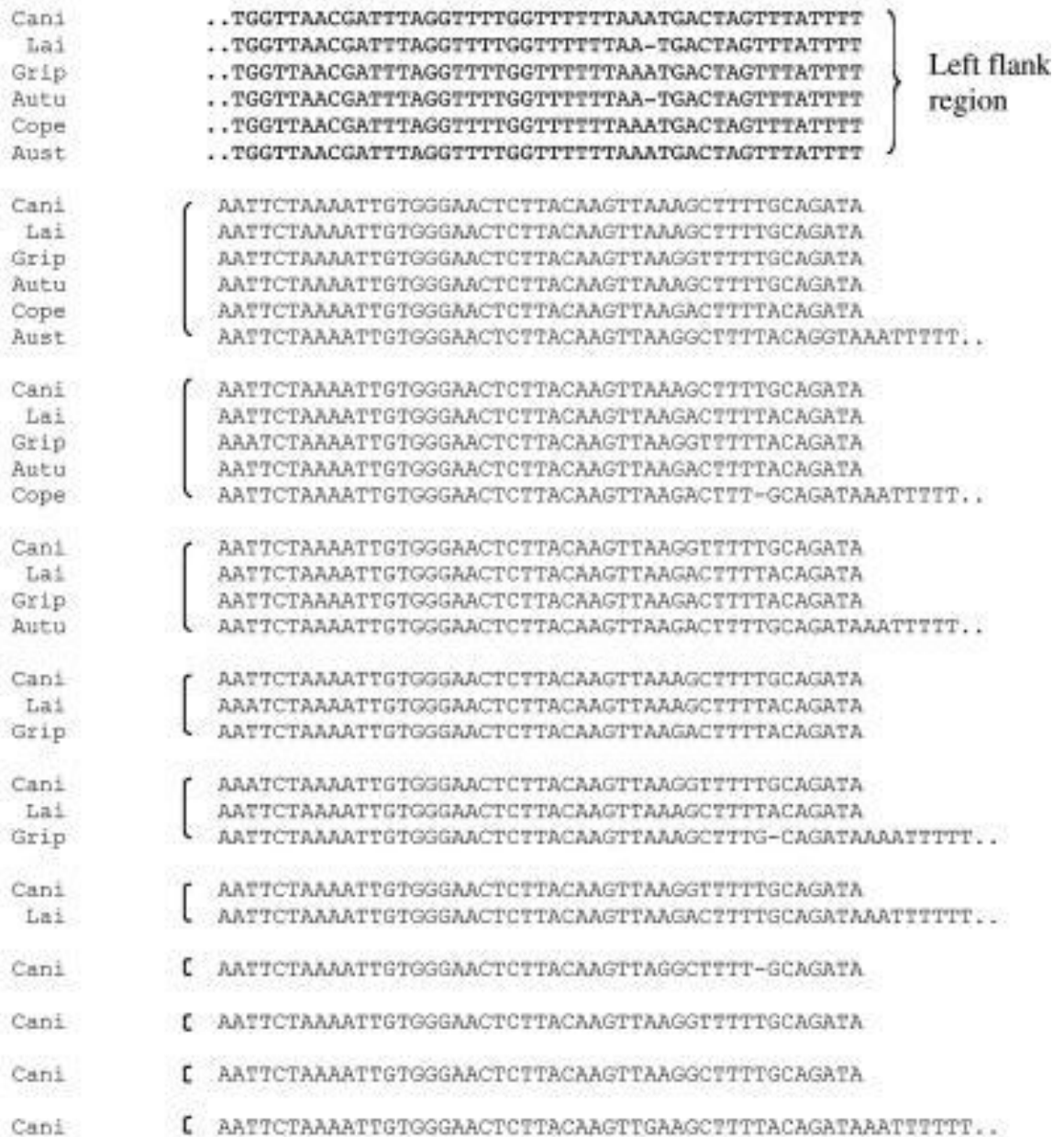


FIGURA 22: Alineación de la secuencia del los *loci* VNTR19. Las llaves de la izquierda indican las unidades de repetición. Cani, *L. interrogans* serovariedad Canicola; Lai, *L. interrogans* serovariedad Lai; Grip, *L. interrogans* serovariedad Grippytyphosa; Autu, *L. interrogans* serovar Autumnalis; Cope, *L. interrogans* serovariedad Copenhageni; Aust, *L. interrogans* serovar Australis. Tomado de Slack *et al.* (2005) <sup>[186]</sup>.

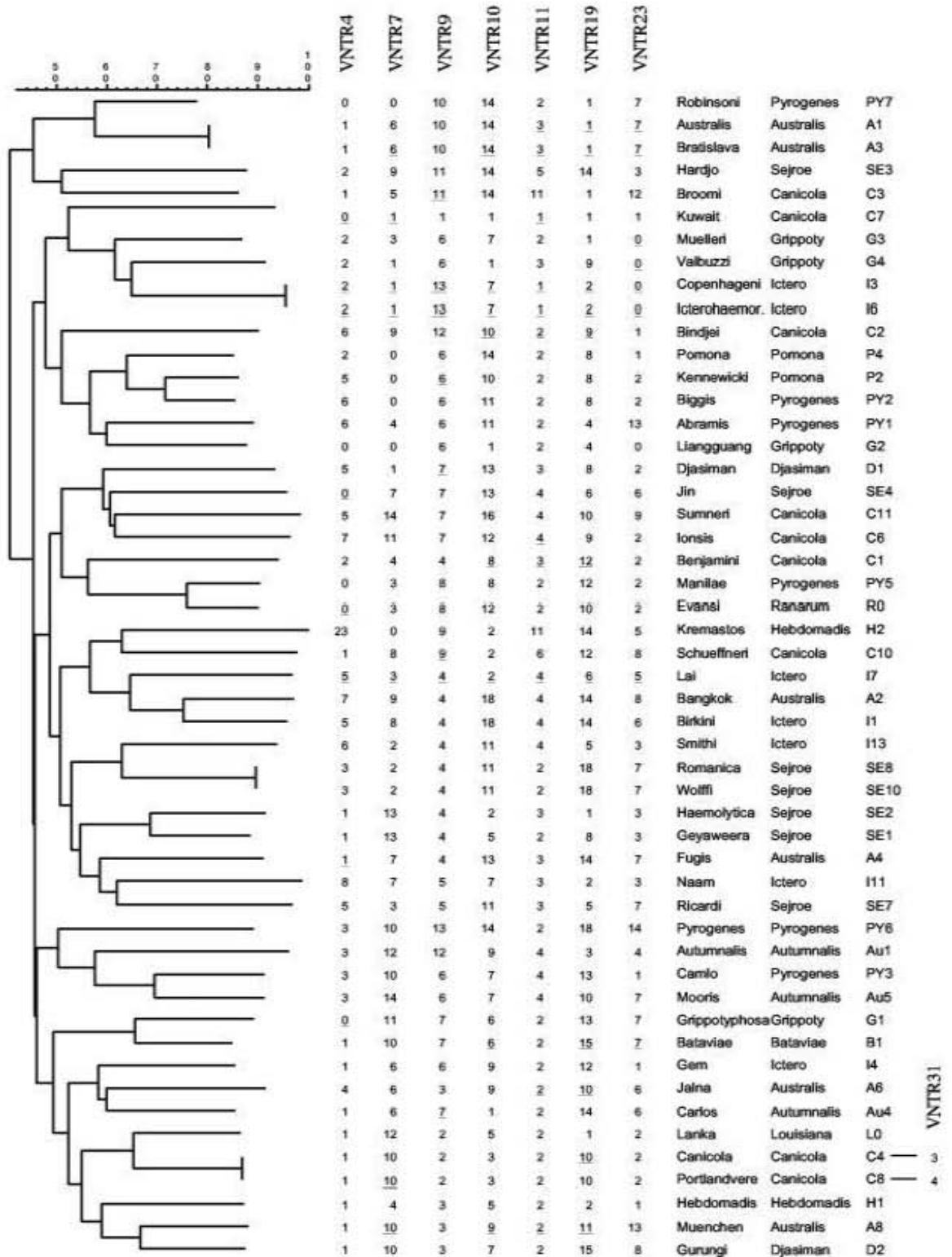


FIGURA 23: Dendrograma de los VNTRs de las serovarieties de *L. interrogans*. El número de copias de cada locus VNTR. Las serovarieties y serogrupos de las cepas de referencia se indican. Los productos de PCR que fueron secuenciados aparecen subrayados. VNTR31 se utiliza para diferenciar entre las serovarieties Canicola y Portlandvere del serogrupo Canicola de *L. interrogans*. Slack *et al.* (2005) <sup>[186]</sup>

### 1.12.5.8 ELECTROFORESIS DE MÚLTIPLES ENZIMAS (MLEE)

Electroforesis de múltiples enzimas o MLEE por sus siglas en inglés (multilocus enzyme electrophoresis) es un método fenotípico, ampliamente utilizado en procariotas así como en eucariotas, posee la deseable combinación de detección/determinación de clones con independencia de su estabilidad <sup>[188]</sup>. Puede definirse como un método genético que analiza la movilidad electroforética de enzimas metabólicas celulares (generalmente entre 14 y 25) solubles en agua, la electroforesis es realizada en geles de almidón o poliacrilamida para estimar los niveles de variación genética dentro de poblaciones y para observar la relación genética entre los aislamientos, las poblaciones, y las especies. Las variaciones observadas en los perfiles electroforéticos corresponden con variaciones en el *locus* o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético <sup>[189-191]</sup>. Esta información se ha utilizado en estudios a gran escala para estimar la diversidad genética y estructura de las poblaciones de una gran variedad de especies de bacterias.

El MLEE también ha sido utilizado en la genética de poblaciones de *Drosophila* <sup>[189]</sup>, plantas <sup>[192]</sup> y humanos <sup>[193]</sup> convirtiéndose en una técnica estándar en la biología evolutiva de células eucariotas. La aplicación de la técnica ha sido utilizada con cautela por carecer de robustez en la diferenciación de especies de eucariotas donde los perfiles electroforéticos de las enzimas no han sido significativos para la clasificación, por ejemplo: los patrones electroforéticos de chimpancés y de seres humanos no muestran diferencias sobre la base de electroforesis debido a que movilidad de ciertas enzimas es idéntica, esto es debido a la cercanía filogenética entre estos primates <sup>[194,195]</sup>.

Esta técnica se utilizó desde 1963 para distinguir cepas bacterias y demostró el poder para revelar la variación genética dentro y entre las diferentes especies. El primer estudio serio sobre genética de poblaciones de una bacteria se realizó en 1973 <sup>[196]</sup> en donde se midió la variación alélica enzimática en cinco *loci* en más de 800 cepas de *E. coli*. Posteriormente, se realizaron otros trabajos en *E. coli* y más recientemente se ha aplicado en estudios a gran

escala de la estructura genética de poblaciones de *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella newport*, *Bordetella spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp.*, *Yersinia ruckeri*, *Klebsiella oxytoca*, y *Rhizobium spp.* entre otros, con el objetivo principal de distinguir cepas en estudios epidemiológicos <sup>[197,198]</sup> .

Estudios recientes de varias proteínas de secuencia conocida indican que la electroforesis en gel puede detectar una variación de entre 80-90% de las sustituciones de aminoácidos <sup>[199]</sup>. Sin embargo, debido a que algunas sustituciones no afectan a la movilidad electroforética, principalmente por sustituciones silenciosas <sup>[200]</sup>. En contraste el estudio genético podría aun en el caso de encontrar tan sólo cuatro alelos por *locus*, estudiando 20 *loci*, se podrían conseguir hasta 420 genotipos diferentes. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. En este caso el marcador tiene alguna de las cualidades deseables en la epidemiología a largo plazo, pero está nuevamente basado en la generación de patrones de bandas en geles, con los inconvenientes ya señalados anteriormente. Así pues, las actuales facilidades de acceso a la secuenciación del ADN en muchos de los laboratorios de microbiología permitieron el desarrollo del MLST manteniendo los principios del MLEE <sup>[201]</sup>.

En la figura 24 se muestra el filograma derivado de MLEE en *Leptospira* a partir de las enzimas aconitasa, adenilato kinasa, fumarasa, isocitrato deshidrogenasa, fosfoglucosa isomerasa, malato deshidrogenasa, manosafosfato isomerasa, catalasa, peptidasas 4 y 5, fosfatasa alcalina y glutamato deshidrogenasa 2. Con la combinación de estas doce enzimas, de 30 cepas utilizadas se obtuvieron 25 tipos electroforéticos <sup>[202]</sup>.

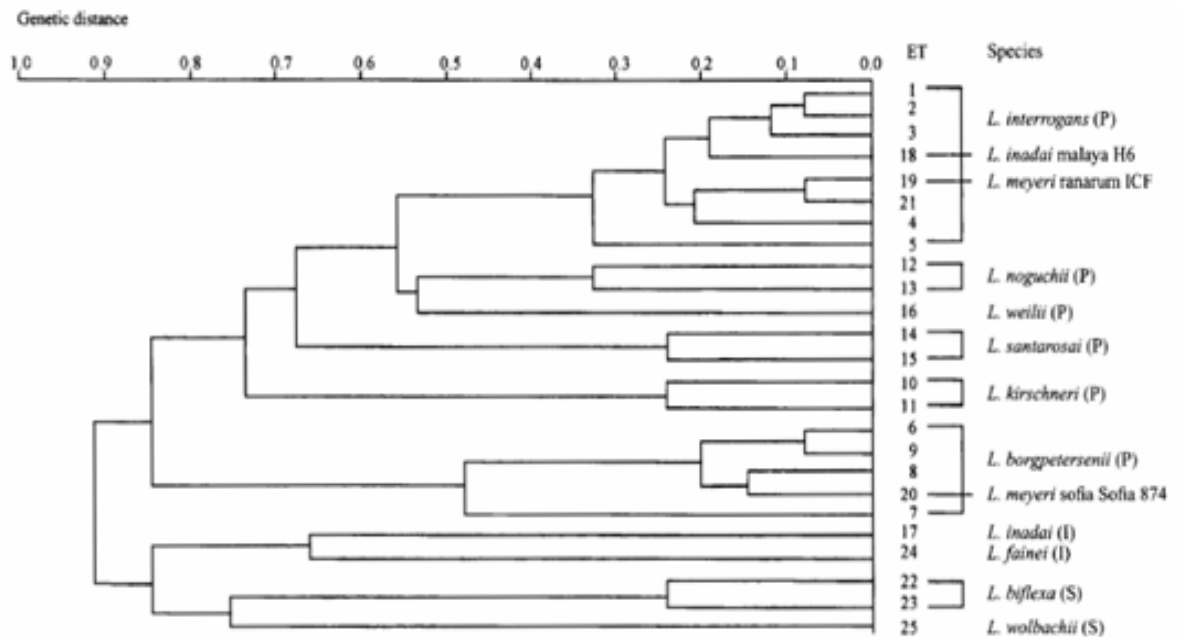


FIGURA 24: Filograma que representa la relación genética del género *Leptospira* por MLEE. El número corresponde a cada uno de los 25 tipos electroforéticos obtenidos para las cepas patógenas (P), Intermedias (I) y saprofitas (S). Letocart *et al.* (1999) <sup>[202]</sup>.

### 1.12.5.9 TIPIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE LOCUS MÚLTIPLES (MLST)

Es un método para caracterización de aislados microbianos por medio de la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos internos de aproximadamente 500 pb de longitud, de seis a ocho genes altamente conservados, previamente seleccionados. Posteriormente, se realiza el análisis y la comparación de las secuencias con herramientas de informática, donde a cada gen se le atribuye una numeración arbitraria y progresiva de acuerdo al número de alelos encontrados. A cada combinación de alelos o al perfil, se le asigna entonces un número de tipo de secuencia (ST). Con esta información se crea una base de datos, la cual puede ser constatada y puesta a disposición de la comunidad <sup>[201]</sup>. Esta técnica fue diseñada principalmente para estudios epidemiológicos globales y tiene la ventaja de ser reproducible. Además, los



datos pueden ser compartidos electrónicamente sin la necesidad del tránsito de cultivos vivos [203]. Al estar basada en secuenciación de ADN produce resultados objetivos y son fácilmente almacenados en bases de datos accesibles en un sitio de la red [201, 204,205]. Esta información está conformada por una serie de datos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos, que son definidos por el grupo o grupos responsables del desarrollo del método (curador o curadores) en la especie en cuestión ([www.mlst.net](http://www.mlst.net), [pubmlst.org](http://pubmlst.org), [www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/), [mlst.ucc.ie/mlst/dbs/](http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/), [mlstdb.hku.hk:14206/MLST\\_index.html](http://mlstdb.hku.hk:14206/MLST_index.html)).

El sistema está diseñado de forma dinámica, para poder enviar las secuencias de los nuevos aislados, solicitar la asignación de los números de alelos y tipo de secuencias. Esta nueva asignación es gestionada por el curador, que supervisa los datos suministrados por el usuario en un archivo de Excel. Si se trata de un alelo nuevo, no incluido en la base de datos, entonces es preciso enviar los cromatogramas en archivo (\*.ab1) generado por el secuenciador automático [206].

Este método de identificación permite realizar comparaciones evolutivas entre las cepas aisladas en la región de estudio y otras encontradas en otras partes del mundo, favoreciendo el intercambio rápido y preciso de información entre diferentes laboratorios alejados geográficamente entre sí. Lo anterior es de ayuda para realizar estudios epidemiológicos precisos de la variabilidad acumulada en el genoma del microorganismo de interés en su proceso de dispersión geográfica y temporal [201].

Por la utilización rutinaria de la secuenciación de nucleótidos y por la sencillez del análisis de datos, la MLST es ampliamente utilizada en la epidemiología molecular de diferentes microorganismos; actualmente existen esquemas desarrollados para más de 60 bacterias (la mayoría patógenas) [203], así como para hongos unicelulares y pluricelulares [207,208] y cuyas bases de datos han estado disponibles desde varios años [206, 209].

Esta técnica fue desarrollada originalmente en cepas de *Neisseria meningitidis*, aún cuando la estructura poblacional de *Neisseria* no es clonal por MLST [210]. Adicionalmente, también sirvió para determinar que los procesos de

recombinación provocan una rápida diversificación de los clones, lo que supone un aumento en la dificultad para reconocer las líneas clonales tras un proceso de evolución geográfica y temporal. El MLST clasificó las líneas clonales hipervirulentas, identificando el desplazamiento geográfico y temporal, de todas las variantes genéticas que evolutivamente van surgiendo, asignando la misma línea clonal hipervirulenta a esas variantes <sup>[211]</sup>. Esto ha permitido hipotetizar que muy probablemente las líneas clonales hipervirulentas evolucionan muy rápidamente <sup>[212]</sup>.

La identificación de nuevas líneas clonales hipervirulentas que sustituyen a las que circulan en una zona geográfica concreta, puede predecir la aparición de ondas epidémicas <sup>[213]</sup>, lo que es de gran utilidad en la toma ágil de decisiones en salud pública <sup>[214]</sup>.

El procedimiento general de análisis por MLST puede resumirse de la siguiente forma.

A) El primer paso consiste en la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos de los genes previamente seleccionados. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las secuencias ya existentes en la base de datos, si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los números de alelos ya identificados; en caso contrario, asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. La asignación de los alelos se realiza de forma inequívoca al secuenciar ambas hebras de ADN, por lo que las variaciones en la secuencia de ADN son de esta forma verificadas por un curador.

B) Una vez asignado un número a cada alelo, siempre utilizando el mismo orden de los genes, podemos generar un perfil alélico que será la combinación de los seis o siete alelos ya asignados.

C) La comparación entre las cepas se realiza exclusivamente con el perfil alélico y así se adjudica el tipo de secuencia. Con este sistema, es sencilla la valoración del grado de proximidad entre los aislados, simplemente comprobando el número de alelos compartidos entre perfiles diferentes <sup>[206, 209]</sup>.

La existencia de bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado MLST están accesibles mediante página web y funciona como nexo común para todos los posibles usuarios, pudiendo realizarse todo el proceso de consultas y análisis así como enviar las propias secuencias de los nuevos aislados para la inclusión en las bases de datos desde cualquier lugar del mundo <sup>[201, 215]</sup>.

Este método ha sido adaptado para poder ser aplicado en muestras biológicas (LCR, sangre, suero, exudados, etc.) en ausencia de cultivo <sup>[216]</sup>. En este caso, la estrategia pasa por la realización de una PCR anidada con iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes de los fragmentos amplificados en el esquema normal de MLST. Esta estrategia funciona a partir de muestras clínicas para neumococos y meningococos lo que indica que puede ser utilizada en todos los microorganismos en los que se ha desarrollado MLST (Cuadro 9).

La caracterización de los aislados de *Leptospira* mediante MLST ha demostrado ser una técnica altamente robusta, portátil, no ambigua y no está basada en patrones electroforéticos, lo cual permite conocer la especie, serogrupo y serovariedad de los aislados.

La primera propuesta de la técnica de MLST aplicada en la tipificación de cepas de *Leptospira* propuso los genes *adk* (adenilato cinasa), *icdA* (isocitrato deshidrogenasa), *secY* (pre-proteína translocasa SecY), *lipL32* (lipoproteína de membrana externa LipL32), *lipL41* (lipoproteína de membrana externa LipL41) y *rrs* (16S rRNA) para clasificar a 41 cepas de referencia y 79 aislados de 6 especies diferentes que contienen el mayor porcentaje de serovariedades patógenas, donde los últimos tres genes presentan mediano poder discriminatorio <sup>[217]</sup>, la publicación carece de los tipos de secuencias (ST) de cada serovariedad. Técnicamente, al utilizar genes altamente variables aumenta la robustez de la técnica por tal razón es necesario sustituir los genes que presentan menor variabilidad <sup>[217]</sup>.

CUADRO 9: PÁGINAS ELECTRÓNICAS DE MLST Y MICRORGANISMOS EN LOS QUE SE HA APLICADO LA TÉCNICA

Colegio Imperial de Londres ( <a href="http://www.mlst.net">http://www.mlst.net</a> )	Universidad de Oxford ( <a href="http://pubmlst.org">http://pubmlst.org</a> )	Instituto Pasteur ( <a href="http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/">http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/</a> )	Universidad de Cork ( <a href="http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/">http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/</a> )	Centro de Investigación sobre Inmunidad e Infección ( <a href="http://mlstdb.hku.hk:14206/MLST_index.html">http://mlstdb.hku.hk:14206/MLST_index.html</a> )
<p>Borrelia burgdorferi Bacillus cereus Burkholderia pseudomallei Candida albicans Candida glabrata Candida krusei Candida tropicalis Campylobacter jejuni Cryptococcus neoformans Escherichia coli Enterobacter faecalis Enterobacter faecium Haemophilus influenzae Helicobacter pylori Leptospira spp. Moraxella catarrhalis Neisseria meningitidis Streptococcus agalactiae Staphylococcus aureus Salmonella enterica Streptococcus epidermidis Streptococcus pneumoniae Streptococcus pyogenes Streptococcus suis Vibrio vulnificus</p>	<p>Acinetobacter baumannii Arcobacter spp. Bacillus cereus Bordetella spp. Brachyspira hyodysenteriae Brachyspira intermedia Brachyspira spp. Burkholderia cepacia Campylobacter fetus Campylobacter helveticus Campylobacter insulaenigrae Campylobacter jejuni Campylobacter coli Campylobacter lari Campylobacter upsaliensis Chlamydiales spp Clostridium botulinum Clostridium difficile Clostridium septicum Corynebacterium diphtheriae Cronobacter spp Haemophilus paraseis Helicobacter pylori Mannheimia haemolytica Neisseria spp Pasteurella multocida Porphyromonas gingivalis Propionibacterium acnes Pseudomonas aeruginosa Sinorhizobium spp Stenotrophomonas maltophilia Streptococcus agalactiae Streptococcus oralis Streptococcus uberis Streptococcus zooepidemicus Streptomyces spp Vibrio parahaemolyticus Vibrio vulnificus Wolbachia spp Xylella fastidiosa</p>	<p>Acinetobacter baumannii Bifidobacterium Clostridium difficile Escherichia coli Flavobacterium psychrophilum Klebsiella pneumoniae Lactobacillus casei Listeria monocytogenes Pantoea agglomerans Plesiomonas shigelloides Propionibacterium freudenreichii Streptococcus thermophilus</p>	<p>Escherichia coli Moraxella catarrhalis Salmonella enterica Yersinia pseudotuberculosis</p>	<p>Laribacter hongkongensis Pencillium marneffeii</p>

En una segunda propuesta se utilizaron los genes *pntA* (NAD(P) transhidrogenasa subunidad alfa), *sucA* (2-oxoglutarato deshidrogenasa decarboxilasa), *pfkB* (ribocinasa), *tpiA* (triosefosfato isomerasa), *mreA* (proteína determinante de la forma bacilar rodA), *glmU* (UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa) y *fadD* (ligasa de CoA y ácidos grasos de cadena larga), donde se obtuvo el mismo tipo de secuencia en aislados de humanos y roedores de la misma región geográfica, asumiendo que es la misma cepa infectante de la especie *L. interrogans*. La base de datos se encuentra en el sitio web y no da información del uso en las otras especies <sup>[218]</sup>.

En una tercera propuesta se utilizaron los genes *accA2* (probable cadena alfa acetil-propionil-coenzima A carboxilasa), *ccmF* (Citocromo C), *czcA* (bomba de eflujo de metales pesados), *gcvP* (glicina deshidrogenasa), *groEL* (chaperonina de choque térmico), *poIA* (ADN polimerasa 1) y *recF* (proteína de replicación y reparación de ADN), la cual solo fue presentada en la 5ta reunión de la International Leptospirosis Society <sup>[219]</sup>.

Las tres propuestas difieren en su totalidad en los genes utilizados y carecen de información a cerca de las características discriminatorias de cada gen. Esto crea confusión en cuanto a que esquema utilizar y los alcances de cada propuesta.

## CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS

La variación genética del gen codificante de GspD proporciona suficiente poder discriminatorio para ser utilizado en la técnica de Multiple *Locus* Sequencing Typing (MLST), para la caracterización de cepas de *Leptospira*.

## CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el gen *gspD* en la técnica de Multiple Locus Sequencing Typing (MLST), para la caracterización de aislados de *Leptospira*.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los tipos de secuencias (STs), de cepas de referencia representantes de 6 especies de *Leptospira* y de 18 cepas aisladas en México.
- Comparar los tipos de secuencias encontrados entre cepas de referencia y aislados nacionales de *Leptospira*.
- Comparar los dos esquemas de MLST, el propuesto por Ahmed *et al.* (2006), que utiliza los genes: *adk*, *icdA*, *secY*, *lipL31*, *lipL42* y *rrs2* y el propuesto por Thaipadungpanit *et al.* (2007) que utiliza los genes: *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* y *fadD*.
- Identificar los tipos de secuencias (STs) encontrados por región del país y en cada especie animal.
- Obtener los alelos de *gspD* a partir de cepas de referencia representantes de diferentes especies y cepas de *Leptospira* aisladas en México.
- Comparar la variabilidad alélica entre *gspD* y los demás genes propuestos en los dos esquemas.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

**CAPÍTULO 4.**

**ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
*Leptospira borgpetersenii* SEROVAR Ballum**

Carlos Alfredo Carmona Gasca<sup>1</sup>, Albert I Ko<sup>2</sup>, Niyaz Ahmed<sup>3</sup>, Rudy Hartskeerl<sup>4</sup>, Alejandro De la Peña-Moctezuma<sup>1</sup>



1 **ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Leptospira***  
2 ***borgpetersenii* SEROVAR Ballum**

3

4 Carlos Alfredo Carmona Gasca<sup>1</sup>, Albert I Ko<sup>2</sup>, Niyaz Ahmed<sup>3</sup>, Rudy Hartskeerl<sup>4</sup>,  
5 Alejandro de la Peña-Moctezuma<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup>*Grupo de Investigación en Leptospira y Leptospirosis, Centro de Enseñanza*  
8 *Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de*  
9 *Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México;*  
10 *carmonagasca@yahoo.com.mx, delapema@unam.mx* <sup>2</sup>*Weill Cornell Medical*  
11 *College and Oswaldo Cruz Foundation / Brazilian Ministry of Health, Salvador,*  
12 *Brazil; alk2001@med.cornell.edu* <sup>3</sup>*Pathogen Biology Laboratory School of Life*  
13 *Sciences, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India;*  
14 *ahmed.nizi@gmail.com* <sup>4</sup>*KIT Biomedical Research, KIT (Koninklijk Instituut voor*  
15 *de Tropen / Royal Tropical Institute) Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam,*  
16 *The Netherlands; r.hartskeerl@kit.nl.*

17

18 Author responsible for correspondence: Alejandro de la Peña Moctezuma.  
19 Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en  
20 Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional  
21 Autónoma de México, Km 8.5 Carretera Tequisquiapan – Ezequiel Montes,  
22 Municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México. Ph: (52414) 291 8100, Fax:  
23 (52414) 291 8105. E-mail: delapema@unam.mx

24

1 Abstract

2 Rodents are the main reservoirs of pathogenic leptospires which spread the  
3 organism to the environment and become a major risk factor for infection to  
4 both, animals and humans. In order to evaluate this, 50 mice were caught in a  
5 dairy farm with history of leptospirosis in central Mexico. All rodents were  
6 identified as *Mus musculus*. Positive titers ( $\geq 1:20$ ), were obtained in 46% of  
7 them by the microscopic agglutination test (MAT), where the most common  
8 serovars detected were: Ballum, 38% (n=19), Canicola, 10% (n=5) and  
9 Australis, 2% (n=1). Three isolates (6%) were obtained from kidneys by cultures  
10 of macerates. The cultures were identified as *L. borgpetersenii* serovar Ballum  
11 by the cross-MAT, IS 1533-based PCR assay, the *rrs2* gene sequence analysis,  
12 a restriction fragment length polymorphism (RFLP) on a 1,650 bp *gspD* to *gspE*  
13 DNA amplicons, and by multiple locus sequence typing (MLST). As far as we  
14 know, this is the first report on the isolation of *L. borgpetersenii*, serovar Ballum,  
15 recovered from *Mus musculus* in Mexico.

16 **Keywords:** *Mus musculus*; mice; leptospirosis.

17

## 1 **Introduction**

2 Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic *Leptospira*  
3 serovars. Within this genus, thirteen pathogenic species have been identified: *L.*  
4 *alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L.*  
5 *kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*,  
6 *L. wolffii*, (International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008) and six  
7 non-pathogenic species: *L. biflexa*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L.*  
8 *wolbachii* and *L. yanagawae*, (Cerqueira and Picardeau, 2009; Adler and De la  
9 Peña-Moctezuma 2010). These species include over 300 serovars,  
10 morphologically non distinguishable. *L. interrogans* includes the highest number  
11 of pathogenic serovars, however, other serovars from different species have  
12 also shown to cause disease in man and domestic animals (Ko *et al.*, 2009).

13 Since the discovery of the disease, rodents have been recognized as the major  
14 reservoirs of pathogenic leptospire eliminating large numbers of infecting  
15 organism in the urine (Ko *et al.*, 2009), thus participating directly and indirectly  
16 in the transmission of leptospirosis to man and other animal species coexisting  
17 in a geographical area, in countries with favorable climatic conditions (Laras *et*  
18 *al.*, 2002), (Vijayachari, 2008). Important outbreaks caused by serovar Ballum  
19 have been identified in Cuba, assuming that rodents were the source of the  
20 infection and the potential source of infection to other animal species (Gonzalez  
21 *et al.*, 2004), (Ko *et al.*, 2009).

22 In spite of improvement in diagnostic techniques and control measures,  
23 leptospirosis is still a major public health problem, mainly in under-developed  
24 areas of developing countries (Ko *et al.*, 2009). Routine diagnosis of the

1 disease is done by serological methods (MAT and ELISA) however; it is always  
2 important to recover the organism in culture, not just as an irrefutable proof of  
3 the disease, but also because of the epidemiological data obtained for further  
4 prevention and control. The identification of the infecting strain provides  
5 information about the common serovars circulating in a given area and so,  
6 appropriate control measures might be implemented Isolates identification has  
7 been achieved among others, by cross absorption agglutination (Ko *et al.*,  
8 2009), restriction fragment length polymorphism, arbitrarily primed PCR (Perolat  
9 *et al.*, 1994), pulsed field gel electrophoresis (Herrmann *et al.*, 1992),  
10 fluorescent amplified fragment length polymorphism (Vijayachari *et al.*, 2004),  
11 analysis of the Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) (Majed *et al.*,  
12 2005), and the Multi Locus Sequencing Typing (MLST) (Ahmed *et al.*, 2006). In  
13 Mexico, previously reported *Leptospira* isolates have been identified as *L.*  
14 *interrogans* by traditional approaches (Moles *et al.*, 2002). On the other hand,  
15 MAT studies have detected the presence of antibodies against other serovars,  
16 which nevertheless have not yet been isolated. This work reports three  
17 *Leptospira* isolates obtained from mice captured in a dairy farm in central  
18 Mexico and their characterization as *Leptospira borgpetersenii* serovar Ballum  
19 by a modified MLST and a *gspD* - *gspE* RFLP approach. Characterization was  
20 further verified by cross microscopic agglutination, the IS1533- based PCR  
21 assay, and *rrs2* gene sequence analysis and MLST.

22

## 1 **Materials and Methods**

### 2 Capture of rodents and culture of samples

3 Fifty mice (*Mus musculus*) were captured in different areas of a dairy farm  
4 located in central Mexico (19° 44' 11" N, 99° 9' 1" E; 2,295 MASL). Sherman-  
5 type traps used to capture mice were randomly distributed to give the same  
6 effort unit per trap. Captured rodents were transported alive to the laboratory  
7 where they were euthanized by intraperitoneal inoculation of sodium  
8 pentobarbital (100-180 mg/kg). Blood was obtained by cardiac puncture and  
9 sera obtained to perform the MAT. Necropsies were practiced under aseptic  
10 conditions and the liver and one kidney were collected and used for culture in  
11 semisolid Fletcher and liquid EMJH media (Myers, 1985). Two ten fold dilutions  
12 in each media were performed and the cultures incubated at 30 °C for up to four  
13 months.

14

### 15 Cross-agglutination

16 Hyperimmune sera were produced in 1.5 kg rabbits by intravenous inoculation  
17 of *Leptospira* in Fletcher medium cultures (30 °C per 7 – 10 days). Inocula were  
18 obtained in volumes of 1, 2, 4 and 6 ml, from the so called Dinger zone at one  
19 week intervals. Leptospire were inactivated at 56 °C for half an hour, before  
20 inoculation into rabbits (Myers, 1985). Rabbit's sera were clarified by  
21 centrifugation at 903 xg / 5 min and kept frozen until the MAT was performed.  
22 Twenty nine *Leptospira* reference strains were used; the strains were kindly  
23 donated by the WHO/FAO/OIE-Collaborating Centre for Reference and  
24 Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region, in Brisbane,

1 Queensland, Australia (Table 1). The reference strains were cultured in liquid  
2 EMJH medium at 30 °C for 7 days and the MAT was performed as previously  
3 described (Myers 1985). A titer of 1:20 was considered as the positive cutoff  
4 point (Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2009).

5

#### 6 DNA extraction and Polymerase Chain Reaction

7 Isolates obtained were grown in 100 ml of EMJH medium and centrifuged at  
8 10,000 xg for 30 min. DNA extraction was performed by the guanidine  
9 thiocyanate and chloroform-isoamyl alcohol method as described previously  
10 (Boom *et al.*, 1990). To determine whether isolates were pathogenic or  
11 nonpathogenic, two PCR assays were done using the GI : GII and B64-1 : B64-  
12 2 sets of primers, specific for pathogenic serovars (Gravekamp *et al.*, 1993),  
13 and the MILL1801 and MILL1802 pair of primers, specifically designed for the  
14 amplification of a 1,289 bp DNA fragment expanding genes in the *rfb*  
15 lipopolysaccharide biosynthetic locus of non-pathogenic leptospire (Mena,  
16 2006). The amplified DNA fragments were visualized on ethidium bromide-  
17 stained agarose gels. Analysis of the obtained DNA amplicons was done in an  
18 image analyzer apparatus (Gel Logic 200, Kodak®).

19

#### 20 IS1533-based PCR assay

21 The assay was performed as previously described (Zuerner *et al.*, 1995) with  
22 slight modifications. PCR reactions were done in a 50 µl final volume,  
23 containing 25 ng DNA, 10 pmol of the forward EPL-2 and the EPR-2 reverse  
24 primers, 200 µmol of dNTPs (Roche®), 2 U of Expand Long High Fidelity DNA-  
25 polymerase (Roche®) and 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Conditions were as follow: one step

1 of denaturation at 94 °C / 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C /  
2 30 sec, alignment at 55 °C / 50 sec and extension at 68 °C / 6 min, increasing  
3 10 seconds to each cycle from cycle 15 up to cycle 40, and a final extension  
4 step at 68 °C / 7 min. Amplified DNA fragments were analyzed as described for  
5 PCR amplicons (Zuerner *et al.*, 1995).

6

7 RFLP of a *gspD-gspE* DNA amplicons

8 One set of two degenerate primers was designed: the forward MILL2357 primer  
9 and the reverse MILL2358 primer (Table 2), to amplify a 1,650 bp DNA  
10 fragment expanding from *gspD* through to *gspE*, (Mena, 2006). DNA  
11 amplification was done in 50 µl reactions, containing 25 ng DNA, 10 pmol of  
12 each primer, 200 µmol dNTPs (Invitrogen®), 2 U of Taq DNA Polymerase  
13 (Roche®) and 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>. PCR conditions were: an initial denaturation step  
14 at 94 °C / 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C / 50 sec,  
15 alignment at 58 °C / 50 sec, and extension at 72 °C / 110 sec and a final  
16 extension step at 72 °C / 7 min. PCR products were digested with each *HindIII*,  
17 *EcoRV*, *BglII*, *Clal* and *KpI* restriction enzymes (Invitrogen®), in a final reaction  
18 volume of 25 µl, including 1 µl BSA buffer (Invitrogen®). Digestions were  
19 incubated at 37 °C for 1 h and DNA digests were analyzed as described for  
20 PCR reactions.

21

22 *rrs2* sequencing.

23 The sequencing of the 16S rRNA gene (*rrs2*), was performed at the Fio-Cruz  
24 Institute molecular biology laboratory, Salvador, Brazil. Editing and sequence  
25 alignment was done with the Sequencher® version 4.6 software. Sequences

1 analysis was performed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST,  
2 at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), to search for similar sequences in the  
3 databases (Altschul *et al.*, 1990). Alleles were grouped based on the alignments  
4 obtained with the BioEdit tool (Hall, 1999). A phylogenic tree was constructed  
5 using the Neighbor-Joining method with 2,000 replicates and the Kimura 2-  
6 parameters model in the MEGA 4.0 program (Felsenstein, 1985); (Saitou and  
7 Nei, 1987); (Tamura *et al.*, 2007).

8

#### 9 Multiple Locus Sequencing Typing (MLST)

10 The first *Leptospira* MLST scheme was reported by Ahmed *et al.* (2006), such a  
11 scheme is based on the comparative analysis of genes *adk*, *secY*, *icdA*, *lipL32*,  
12 *lipL41* and *rrs2*. On the other hand, the available website for *Leptospira* MLST  
13 (<http://leptospira.mlst.net>), operates with a complete different list of genes  
14 including *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *mreA*, *pfkB* and *fadD* (Thaipadungpanit *et al.*,  
15 2007). In order to determine the efficiency of such MLST schemes, we  
16 compared both to characterize three *Leptospira* isolates. Primer sets and PCR  
17 conditions were as previously reported. Amplicons were submitted for  
18 sequencing to Macrogen Inc., Seoul, Korea. Sequence analysis and editing  
19 were done with the Sequencher® version 4.6 package. The sequence type (ST)  
20 for the isolates was obtained by comparison of the amplicons sequences with a  
21 data base kindly provided by Professor Niyaz Ahmed, School of Life Sciences,  
22 Hyderabad University, Hyderabad, India. Similarly, the ST for Thaipadungpanit  
23 *et al.* scheme was obtained by submission of the sequences of the  
24 corresponding alleles to the *Leptospira* MLST website.

25



## 1 **Results**

### 2 Isolates, PCR and cross-agglutination identification

3 Twenty three out of 50 mice (46%) were considered as positive to the MAT at  
4 titers  $\geq 1:20$ . Serovars detected were: Ballum 38% (n=19), Canicola 10% (n=5)  
5 and Australis 2% (n=1). The highest antibody titers were 1:80 for serovar  
6 Ballum. Three isolates (6%), were obtained and identified as pathogen  
7 leptospire by the amplification of a 285 bp DNA fragment with the specific  
8 primers set GI : GII (Gravekamp *et al.*, 1993); no amplification was obtained  
9 with the B64-1 : B64-2 set of primers or the MILL1801 : MILL1802 specific  
10 primers for non pathogenic *Leptospira*, (data not shown). Serological  
11 identification of the isolates was performed by cross-agglutination with rabbit  
12 specific antiserum and a panel of 23 reference strains, where the homologous  
13 antiserum showed titers as high as 1:25,600 against the *L. borgpetersenii*  
14 serovar Ballum Mus 127 reference strain.

15

### 16 *rrs2* sequence analysis

17 Analysis of the *rrs2* sequence from the three *Leptospira* isolates confirmed  
18 identity with those serovars of *L. borgpetersenii*. The Megablast tool was used  
19 to search for highly similar sequences showing 99% similarity with the reported  
20 *rrs2* sequence for *L. borgpetersenii* serovar Ballum (GenBank accession no.  
21 FJ154591). In addition, the sequence analysis showed the same allelic form  
22 between the three isolates. Representative sequences from each *Leptospira*  
23 species were obtained from GenBank and were aligned with the BioEdit  
24 software package. The evolutionary relationship based on the DNA sequencing

1 of the 16S rRNA of the three isolates and highly similar sequences obtained  
2 from Genbank was illustrated by a Neighbor-Joining built phylogram, showing  
3 distinct clades of *Leptospira borgpetersenii* serovars. The accession number for  
4 the mice isolates *rrs2* sequence is: HM776722 (Figure 3).

5

#### 6 IS1533-based PCR assay

7 We used the primers EPL-2 and EPR-2 previously described by Zuerner *et al.*  
8 (1995), to obtain the electrophoretic pattern of amplicons for different serovars  
9 (Table 1). Not all serovars showed DNA amplification with such a primer set.  
10 Only serogroups and serovars of *L. borgpetersenii*: Ballum Mus, Ballum  
11 Castellonis, Tarassovi Tarassovi; of *L. interrogans*: Bataviae Paidjan, Sejroe  
12 Sejroe, Sejroe Wolffi and of *L. weilii*: Celledoni Celledoni were identified by this  
13 method. These resulted in an unique electrophoretic pattern, characteristic for  
14 each serovar. By comparison, the three isolates: CRAN13, CRAN14 and  
15 CRAN28 showed a pattern of amplicons identical to those of serovar Ballum  
16 strain Mus 127 (Figure 1).

17

#### 18 RFLP of the *gspD-gspE* DNA fragment.

19 Using degenerate primers, 1,650 bp DNA fragment expanding from *gspD*  
20 through to *gspE* was amplified from seven representative strains of five  
21 pathogenic *Leptospira* species and from the three mice isolates. *EcoRV*  
22 digestion showed one restriction site on Grippotyphosa and Panama serovars,  
23 and two restriction sites on the other eight serovars. *BglII* digestion showed one  
24 restriction site on the amplicons of the serovars: Hardjoprajitno, Canicola,

1 Shermani and Ballum, and two restriction sites on Grippytyphosa and Panama.  
2 On the other hand, *ClaI* did not cut on Hardjoprajitno, Canicola, Grippytyphosa  
3 or Panama DNA amplicons, but showed one restriction site in serovars Ballum  
4 and Castellonis; in contrast, serovar Shermani showed a dissimilar pattern of  
5 digestion with *ClaI* with at least three restriction sites. Finally, there were no  
6 *HindIII* nor *KpI* restriction sites on any of the amplicons. Analysis of the  
7 restriction patterns with the suggested enzymes showed no difference between  
8 the serovars of serogroup Ballum, Castellonis, Mus and the three mice isolates,  
9 CRAN13, CRAN14 and CRAN28, (Figure 2).

10

#### 11 MLST

12 Using Ahmed *et al.* MLST scheme (2006), isolates were also characterized as  
13 serovar Ballum based on the identical sequence type (ST: 250), showed among  
14 the three isolates CRAN 13, 14 and 28 and the reference strain Ballum Mus  
15 127. However with the Thaipadungpanit *et al.* scheme (2007), amplicons were  
16 obtained only for *glmU* and *pntA*, so that no ST was possible to obtain.

17

## 1 Discussion

2 The aim of this study was to evaluate the role of mice as *Leptospira* carriers in a  
3 dairy farm in Central Mexico. Previous reports have shown infection in domestic  
4 animals by isolation of *L. interrogans* serovar Hardjo (Hardjoprajitno) from cattle  
5 (Moles *et al.*, 2002), and *L. interrogans* Portlandvere from pigs (Cisneros *et al.*,  
6 2001). There are also reports of the presence of *L. interrogans* serovars  
7 Canicola, (Castillo-Sánchez *et al.*, 2007), Portlandvere and  
8 Icterohaemorrhagiae in dogs (Luna *et al.*, 2008). These results provide  
9 evidence of some of the serovars and species prevalent in México. Diagnostic  
10 of leptospirosis in both, animals and humans is done traditionally by the  
11 microscopic agglutination test. Antibody titers against leptospire such as *L.*  
12 *borgpetersenii* serovars Ballum and Tarassovi, *L. kirshneri* serovar  
13 Grippotyphosa and *L. weilii* serovar Celledoni have been detected in different  
14 domestic animals, nevertheless these serovars have not yet been isolated in  
15 Mexico.

16 In this work, a direct relationship was detected between the presence of  
17 antibody titers  $\geq 1:20$  in mice and the isolation of *L. borgpetersenii* serovar  
18 Ballum. As far as we know, this is the first report on the isolation of *Leptospira*  
19 *borgpetersenii* serovar Ballum from mice (*Mus musculus*) in Mexico.

20 In Mexico, there are several endemic mice species such as those of the  
21 *Baiomys*, *Liomys*, *Peromyscus*, *Osgoodomys*, *Oryzomys*, *Reithrodontomys*  
22 genera and introduced mice species such as *Mus musculus* (Ceballos *et al.*,  
23 2005), hence their presence in addition to their role as *Leptospira* carriers,  
24 represents a potential risk factor of leptospirosis to animals and humans. In a

1 study done in the Cozumel Island, Mexico, (Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2009), it  
2 was reported a 95.7% of MAT positive reactors in mice of the species  
3 *Oryzomys couesi* and *Mus musculus*. Mice have been previously associated as  
4 a source for serovar Ballum infection in some cases of leptospirosis in humans;  
5 such as an infection in a large laboratory colony of Swiss albino mice (Stoenner  
6 *et al.*, 1958) and an accidental human infection in a laboratory, where mice  
7 were the transmitters (Wolff *et al.*, 1949).

8 The IS1533 insertion elements have been found in approximately 40 copies per  
9 genome in *L. borgpetersenii* serovar Hardjo (Hardjobovis), from which this  
10 insertion sequence (IS) was originally discovered (Zuerner and Bolin, 1988).  
11 The IS1533-based PCR assay was designed to exploit the variability in copy  
12 numbers of such insertion sequences in the genomes of some *Leptospira*  
13 serovars (Zuerner *et al.*, 1995). In agreement with that, most of the serovars  
14 and strains we used in the present study showed DNA amplicons when the  
15 IS1533-based PCR assay was performed. Serovars and strains other than  
16 those tested by Zuerner *et al.*, (1995), such as: Australis Ballico, Autumnalis  
17 Akiyami A, Djasiman Djasiman, Grippytyphosa Moskva V, Canicola Hond  
18 Utrecht IV, Pomona Pomona, Pyrogenes Salinem, Javanica Veldrat Bataviae  
19 46 and Icterohaemorrhagiae RGA, did not show any evidence of IS1533  
20 elements using the EPR2 and EPL2 primer set in the PCR assays.  
21 Nevertheless, the assay was discriminative enough to be used for typification of  
22 the three mice isolates: CRAN13, CRAN14 and CRAN28; which showed the  
23 same IS1533 pattern as that of the serovar Ballum, Mus 127 reference strain

1 (Figure 1). Serovar Ballum was not reported either in Zuerner's *et al.* (1995)  
2 work.

3 Evolutionary relationship was determined by sequencing the 16S rRNA of the  
4 three mice isolates and comparison with the GenBank databases (Figure 3).  
5 The phylogram showed that the highest relationship of the three mice isolates is  
6 kept with serovars Castellonis Castellon 3 and Ballum Mus 127 of *L.*  
7 *borgpetersenii* serogroup Ballum. Like ribotyping, other studies have been used  
8 to identify the species of new isolates, such as PCR / RFLP strategies applied  
9 on different genes such as *flaB* (Kawabata *et al.*, 2001), *rrs* and *rrl* (Ralph *et al.*,  
10 1993), and the primer pairs GI:GII or B64-1:B64-2 (Brown and Levett, 1997).  
11 Here, we report the use of RFLP analysis on a 1,650 bp *gspE* through to *gspD*,  
12 DNA fragment as a suitable and straightforward alternative for *Leptospira*  
13 isolates species identification.

14 MLST has been used to characterize new isolates from a variety of pathogenic  
15 and non-pathogenic microorganism ([www.mlst.net/](http://www.mlst.net/), [pubmlst.org/](http://pubmlst.org/), [mlst.ucc.ie](http://mlst.ucc.ie)).  
16 The two most commonly used MLST schemes for *Leptospira* typification are  
17 those proposed by Ahmed *et al.* (2006) and Thaipadungpanit *et al.* (2007). We  
18 found that Ahmed *et al.* MLST scheme was discriminative enough to assign the  
19 ST number 250 to the three mice isolates, which were undistinguishable to  
20 serovar Ballum strain Mus 127. In contrast, Thaipadungpanit *et al.* MLST  
21 scheme was not discriminative enough for typification because five out of seven  
22 genes were not amplified. This scheme is restricted for *L. interrogans* serovars  
23 identification. In contrast, Ahmed *et al.* MLST scheme, has shown to be suitable  
24 for the typification of *Leptospira* species other than *L. interrogans*. Ribotyping,

1 showed a 99% identity between the sequences of the Ballum Mus 127 and  
2 Castellonis Castellon 3 reference strains and the sequences of the three  
3 isolates, resulting in the phylogram shown in Figure 3. Even no one, the  
4 sequence of a smaller 462 bp DNA fragment of the same *rrs2* gene selected for  
5 the MLST approach, showed 100% identity among Ballum Mus 127 and the  
6 three mice *Leptospira* isolates. In overall, the two more discriminative methods  
7 for typification of the mice isolates were the IS1533-based PCR assay and  
8 MLST that allowed the identification up to the serovar level.

9 The isolation of *L. borgpetersenii* serovar Ballum from the kidneys of mice  
10 provides information for future epidemiological studies on the role of mice as the  
11 reservoir of pathogenic leptospires and the potential implication on public health  
12 and so, the implementation of appropriate control measures. Isolation of  
13 *Leptospira* from clinical cases and the serovar identification is a task of great  
14 importance because the serodiagnosis of leptospirosis is focused on the  
15 serovars present in a specific geographical area (Ko *et al.*, 2009).A important  
16 outbreaks caused by serovar Ballum have been identified in Cuba, assuming  
17 that rodents were the source of the infection (Gonzalez *et al.*, 2004). This is a  
18 warning call for public health and disease control, which facilitates the  
19 establishment of control measures in groups at risk.

20

21

1 **Acknowledgements**

2 The authors want to express gratitude to Dr. Jorge Avila García and Mr. Enrique  
3 Herrero for the opportunity to make this study at the “Cantarranas” dairy farm, to  
4 Eliot Zarza for the technical guidance in capturing rodents and Dr. Rodrigo  
5 Medellín for lending the Sherman-like traps. This project was supported by the  
6 UNAM/PAPIIT IN222806, IN221409; and the MACROPROYECTO No. 7 grants  
7 from the Universidad Nacional Autónoma de México as well as the SEP-  
8 CONACyT 83123 grand. The scholarship No. 165530 for the doctorate studies  
9 of Carlos Carmona from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
10 (CONACyT), México, is highly appreciated.

11

12



1 **References**

- 2 Adler, B., de la Peña-Moctezuma, A. 2010. *Leptospira* and Leptospirosis.  
3 Veterinary Microbiology. **140**(3-4): 287–296.
- 4 Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde, M. de L., Vijayachari, P., Machangu, R.S.,  
5 Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A. 2006. Multilocus sequence typing method for  
6 identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species.  
7 Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. **23**(5): 5-28.
- 8 Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local  
9 alignment search tool. Journal of Molecular Biology. **215**(3): 403–410.
- 10 Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A.,  
11 Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M. 2003.  
12 Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious  
13 Diseases. **3**(12): 757–771.
- 14 Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C. L., Wertheim van Dillen,  
15 P.M.E., Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of  
16 nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology. **28**(3): 495-503.
- 17 Brown, P.D., Levett, P.N. 1997. Differentiation of *Leptospira* species and  
18 serovars by PCR- restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and  
19 low-stringency PCR. Journal of Medical Microbiology. **46**(2): 173-181.
- 20 Ceballos, G., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R.A., Domínguez-Castellanos, Y.  
21 2005. Lista actualizada de los mamíferos de México. Revista Mexicana de  
22 Mastozoología. **9**: 21-71.
- 23 Castillo-Sánchez, L., O., Roa, R., M. 2008. Detection of pathogenic *Leptospira*  
24 in asymptomatic dog. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, DF.

1 Cerqueira, G.M., Picardeau, M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing.  
2 Infection, Genetics and Evolution. **9**(5): 760–768.

3 Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the  
4 bootstrap. Evolution. **39**: 783-791.

5 González, M., Batista, N., Machado, M., Savournin, O., Saltarén, A., Sanamé,  
6 A., Ochoa, I., Rodríguez, Y., Naranjo, M., Valdés, Y., González, I., Sierra, G.  
7 2004. Caracterización de cepas de *Leptospira* Ballum aisladas de casos  
8 clínicos. Inmunidad cruzada en hámsters vacunados con vax-SPIRAL®.  
9 Biotecnología Aplicada. **21**(2): 77-81.

10 Gravekamp, C., Van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G.J.,  
11 Van Eys, G.J., Everard, C.O., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J. 1993. Detection  
12 of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers.  
13 Journal of General Microbiology. **139**(8): 1691–1700.

14 Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor  
15 and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series.  
16 **41**: 95-98.

17 Herrmann, J.L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Girons, I.S. 1992.  
18 Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid  
19 method of serovar identification. Journal of Clinical Microbiology. **30**(7): 1696-  
20 1702.

21 Cisneros, P.M.A., Ramírez, N.R., Moles, C.L.P., Gavaldón, R.D., Torres, B.J.,  
22 Rojas S.N. 2002. Aislamiento de *Leptospira* Portland vere a partir de cerdas  
23 que abortaron en México. Revista Cubana de Medicina Tropical, **54**(1): 52-80.

1 International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the  
2 taxonomy of Leptospiraceae. 2008. International Journal of Systematic and  
3 Evolutionary Microbiology. **61**(2011): 698–699.

4 Kawabata, H., Dancel, L.A., Villanueva, S.Y., Yanagihara, Y., Koizumi, N.,  
5 Watanabe, H. 2001. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its  
6 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool  
7 for detection and identification of *Leptospira* spp. Microbiology and Immunology.  
8 **45**(6): 491-496.

9 Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the  
10 molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Review  
11 Microbiology. **7**(10): 736–747.

12 Laras, K., Cao, B.V., Bounlu, K., Nguyen, T.K., Olson, J.G., Thongchanh, S.,  
13 Tran, N.V., Hoang, K.L., Punjabi, N., Ha, B.K., Ung, S.A., Insisiengmay, S.,  
14 Watts, D.M., Beecham, H.J., Corwin, A.L.: 2002. The importance of  
15 leptospirosis in Southeast Asia. American Journal of Tropical Medicine and  
16 Hygiene. **67**(3): 278–286.

17 Luna, A.M.A., Moles, C.L.P., Gavaldón, R.D., Nava, V.C., Salazar, G.F. 2008.  
18 Leptospirosis canina y su problemática en México. Revista de Salud Animal,  
19 **30**(1): 1-11.

20 Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M.  
21 2005. Identification of variable-number tandem-repeat *loci* in *Leptospira*  
22 *interrogans* sensu stricto. Journal Clinical Microbiology. **43**(2): 539-545.

1 Mena B.R. 2006. Análisis *in silico* de los genes *gspD<sub>L</sub>* y *gspE<sub>L</sub>*, del sistema de  
2 secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc. Universidad  
3 Nacional Autónoma de México, México, DF.

4 Moles, C.L.P., Cisneros, P.M.A., Gavaldón, R.D., Rojas, S.N., Torres, B.J.I.  
5 2002. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Revista Cubana de  
6 Medicina Tropical. **54**(1): 24-27.

7 Myers, D.M. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de  
8 leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires: OPS, Nota  
9 Técnica 30.

10 Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., Akritidis, N. 2008.  
11 The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. International  
12 Journal of Infectious Diseases. **12**(4): 351– 357.

13 Perolat, P., Merien, F., Ellis, W.A., Baranton, G. 1994. Characterization of  
14 *Leptospira* isolates from serovars hardjo by Ribotyping, arbitrarily primed PCR,  
15 and mapped restriction site polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology.  
16 **32**(8): 1949-1957.

17 Picardeau, M., Bulach, D.M., Bouchier, C., Zuerner, R.L., Zidane, N., Wilson,  
18 P.J., Creno, S., Kuczek, E.S., Bommezzadri, S., Davis, J.C., McGrath, A.,  
19 Johnson, M.J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R.L., Rood,  
20 J.I., Lajus, A., Davies, J.K., Medigue, C., Adler, B. 2008. Genome sequence of  
21 the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of  
22 *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS ONE. **3**(2): e1607.

23 Ralph, D., McClelland, M., Welsh, J., Baranton, G., Perolat, P. 1993. *Leptospira*  
24 species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and

1 by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. Journal of  
2 Bacteriology. **175**(4): 973-981.

3 Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for  
4 reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. **4**(4): 406-  
5 425.

6 Sotomayor-Bonilla, J., J. 2009. Asociación de *Leptospira* con los roedores  
7 nativos y exóticos de la isla Cozumel, México, Universidad Nacional Autónoma  
8 de México, México, DF.

9 Stoenner, H.G., Grimes, E.F., Thrailkill, F.B., Davis, E. 1958. Elimination of  
10 *Leptospira* Ballum from a colony of Swiss albino mice by use of  
11 chlortetracycline hydrochloride. American Journal Tropical Medicine and  
12 Hygiene. **7**(4): 4.

13 Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular  
14 Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology  
15 and Evolution. **24**(8): 1596–1599.

16 Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L.D.,  
17 Petkanchanapong, W., Limpai boon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A., T.,  
18 Suputtamongkol Y., White, N. J., Edward, J., Feil, D., Nicholas, P.J., Peacock,  
19 S.J. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an  
20 outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Neglected Tropical  
21 Diseases. **1**(1):e56.

22 Vijayachari, P., Ahmed, N., Sugunan, A.P., Ghousunnisa, S., Rao, K.R.,  
23 Hasnain, S.E., Sehgal, S.C. 2004. Use of fluorescent amplified fragment length

1 polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. Journal of  
2 Clinical Microbiology. **42**(8): 3575-3580.

3 Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N. 2008. Leptospirosis: an emerging  
4 global public health problem. Journal of Biosciences. **33**(4): 557–569.

5 Wolff, J.W., Bohlander, H., Ruys, A.C. 1949. Researches on *Leptospira* Ballum:  
6 The detection of urinary carriers in laboratory mice. Antonie van Leeuwenhoek.  
7 **15**(1): 1-13.

8 Zuerner, R.L., Alt, D., Bolin, C.A. 1995. IS1533-based PCR assay for  
9 identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. Journal of Clinical  
10 Microbiology. **33**(12): 3284–3289.

11 Zuerner, R.L., Bolin, C.A. 1988. Repetitive sequence element cloned from  
12 *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis provides a sensitive  
13 diagnostic probe for leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. **26**(12):  
14 2495–2500.

15

1

Table 1. Reference strains used for the MAT in this study

<b>Species</b>	<b>Serovar.</b>	<b>Strain</b>	<b>Serogroup</b>
<b><i>L. biflexa</i></b>	Patoc	Patoc I	Semaranga
<b><i>L. borgpetersenii</i></b>	Ballum	Mus-127	Ballum
	Castellonis	Castellon-3	Ballum
	Hardjo	Hardjobovis	Sejroe
	Javanica	Veldrat Bataviae 46	Javanica
	Mini	Sari	Mini
	Sejroe	Sejroe M-84	Sejroe
	Tarassovi	Perepelitsin	Tarassovi
<b><i>L. interrogans</i></b>	Australis	Ballico	Australis
	Autumnalis	Akiyami A	Autumnalis
	Paidjan	Paidjan	Bataviae
	Bataviae	Van Tienen	Bataviae
	Bratislava	Jez Bratislava	Australis
	Canicola	Hond Utrecht IV	Canicola
	Djasiman	Djasiman	Djasiman
	Hardjo	Hardjoprajitno	Sejroe
	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA	Icterohaemorrhagiae
	Lai	Lai	Icterohaemorrhagiae
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Salinem	Pyrogenes
	Wolffi	3705	Sejroe
	<b><i>L. kirshneri</i></b>	Cynopteri	3522-C
Grippotyphosa		Moskva V	Grippotyphosa
Mozdok		5621	Pomona
<b><i>L. noguchii</i></b>	Muenchen	C90	Australis
	Panama	CZ214K	Panama
<b><i>L. santarosai</i></b>	Shermani	1342-K	Shermani
<b><i>L. weillii</i></b>	Celledoni	Celledoni	Celledoni

2

3

4

1

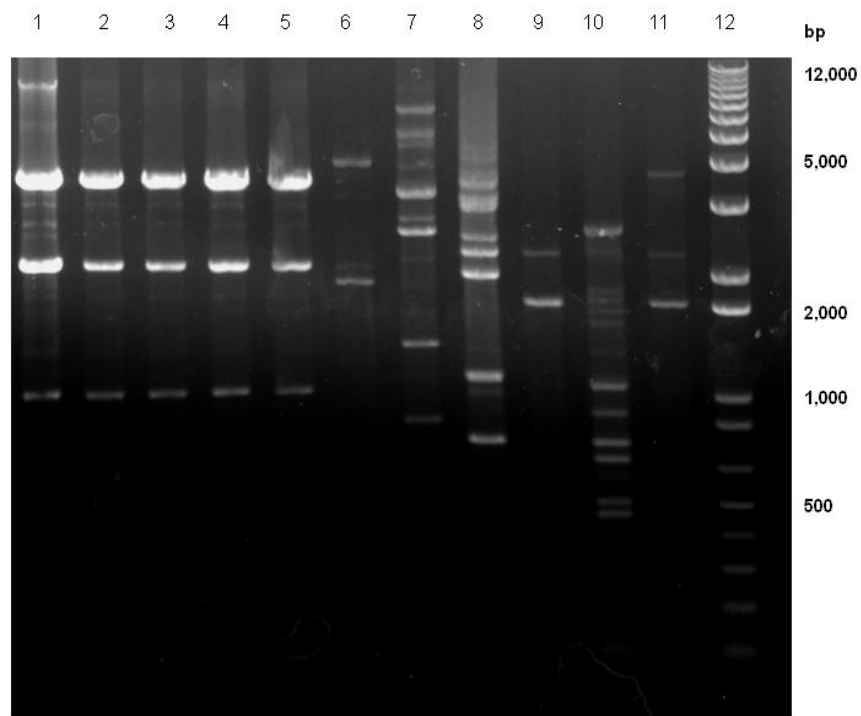
Table 2. Primers sets used in the present study

Primer	Sequence 5'-3'	Size of amplicon (bp)	Use	Reference
GI	CTGAATCGCTGTATAAAAGT	285	Pathogenic serovars identification	Gravekamp <i>et al.</i> (1993)
GII	GGAAAACAAATGGTCGGAAG			
B64-1	ACTAACTGAGAACTTCTAC	563		
B64-2	TCCTTAAGTCGAACCTATGA			
MILL1801	CATGAACCAAGGCATACC	1650	Non-pathogenic serovars identification	Mena (2006)
MILL1802	AGAAGAAGTTTAACGGGG			
MILL2357	ACNGTNAAYGAYCARGARGC			
MILL2358	ACDATNACCATNGGRTCRTC		<i>gspD</i> - <i>gspE</i> , PCR - RFLP	
EPL-2	CTCAACTCTCCAGCACGTTT	Variable patron	<i>IS1533</i> amplification	Zuerner <i>et al.</i> (1995)
EPR-2	CTCGCAAACCTCTCGTCCATT			

2

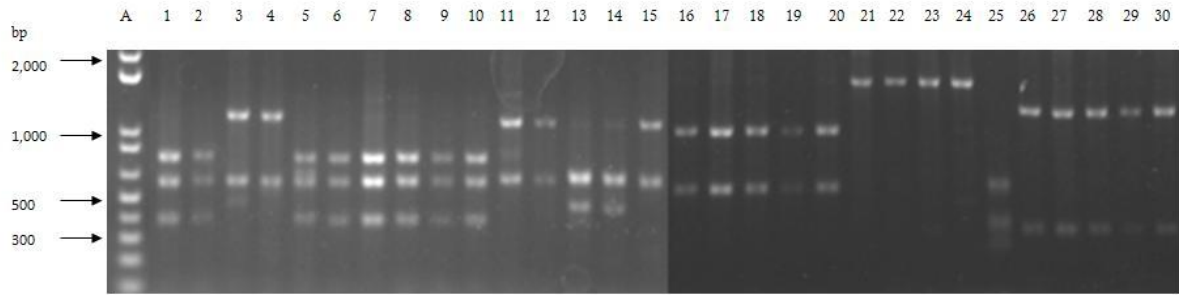
3





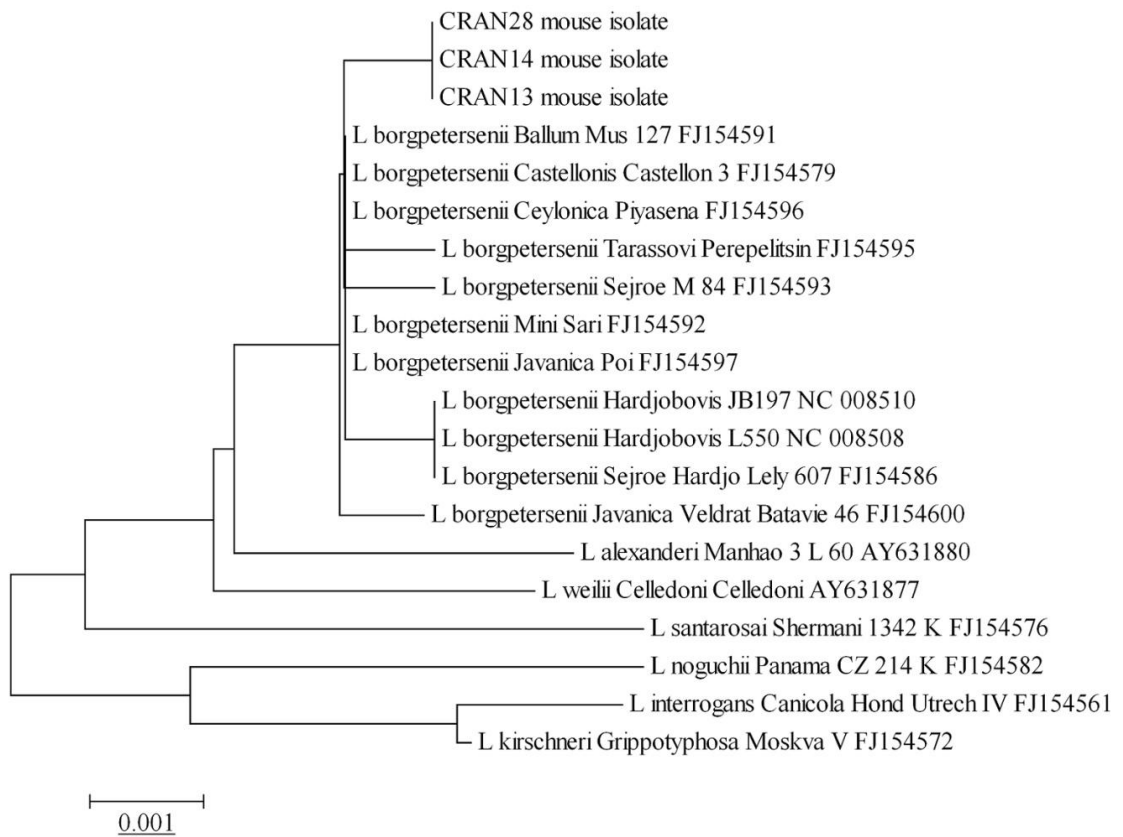
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

Figure1. Agarose gel electrophoresis of the IS 1533-based PCR assay. Lane 1: Ballum Castellonis, Lane 2: Ballum Mus, Lanes 3 through to 5: Isolates CRAN 13, CRAN14, CRAN28, Lane 6: Celledoni Celledoni, Lane 7: Sejroe Sejroe, Lane 8: Tarassovi Tarassovi, Lane 9: Bataviae Paidjan, Lane 10: Muenchen C90, Lane 11: Serjoe Wolffi, Lane 12: Molecular weight marker.



1 Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the restriction fragment length  
2 polymorphism assay on the 1,650 bp DNA amplicons expanding *gspD* through  
3 to *gspE*. Lane A: Molecular weight marker, Lanes 1 through to 10: *EcoRV*  
4 digests; Lanes 11 through to 20: *ClaI* digests; Lanes 21 through to 30: *BglII*  
5 digests. Lanes 1, 11 and 21: Hardjo Hardjoprajitno; Lanes 2, 12 and 22:  
6 *Canicola Hound Utrecht IV*; Lanes 3, 13 and 23: *Grippytyphosa Moskva V*;  
7 Lanes 4, 14 and 24: Panama CZ 214K; Lanes 5, 15 and 25: Shermani 1342 K;  
8 Lanes 6, 16 and 26: *Castellonis Castellon 3*; Lanes 7, 17 and 27: Ballum Mus  
9 127; Lanes 8, 18 and 28: mice isolate CRAN13; Lanes 9, 19 and 29: mice  
10 isolate CRAN14; Lanes 10, 20 and 30: mice isolate CRAN28.

11



1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7

Figure 3. Evolutionary tree derived from the analysis of the sequences of the 16S rRNA of 17 *Leptospira* strains and the sequences of the three mice isolates reported in this study. The phylogram was inferred using the Neighbor-Joining method, with 2,000 replicates. There was a total of 1,469 bp in the final dataset.

1 **CAPÍTULO 5.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10 **DETECCIÓN DE *Leptospira santarosai* Y *L. kirschneri* EN BOVINOS:**  
11 **NUEVOS AISLADOS CON POTENCIAL IMPACTO EN PRODUCCIÓN**  
12 **BOVINA Y SALUD PÚBLICA.**

13

14

15

16 <sup>1</sup>Carlos Alfredo Carmona-Gasca, <sup>2</sup>Lemuel León Lara, <sup>1</sup>Luz Olivia Castillo-  
17 Sánchez, <sup>1</sup>José Manuel Ramírez-Ortega, <sup>3</sup>Albert Ko, <sup>4</sup>Carlos Luna  
18 Palomera, <sup>5</sup>Niyaz Ahmed, <sup>6</sup>Rudy Hartskeerl, <sup>1</sup>Alejandro de la Peña-  
19 Moctezuma.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 **Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial**  
2 **impacto en producción bovina y salud pública**

3  
4 Este manuscrito es parte del trabajo de tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la  
5 Salud Animal del primer autor.

6 Autor responsable de correspondencia: Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma. Centro de  
7 Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina  
8 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 8.5 Carretera  
9 Tequisquiapan – Ezequiel Montes, Municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México. Tel (52414)  
10 291 8100, Fax: (52414) 291 8105. Correo electrónico: delapema@unam.mx

11  
12 \*Carlos Alfredo Carmona-Gasca \*\*Lemuel León Lara \*Luz Olivia Castillo-Sánchez \*José Manuel  
13 Ramírez-Ortega \*\*\*Albert Ko †Carlos Luna Palomera ‡Niyaz Ahmed °Rudy Hartskeerl \*Alejandro de la  
14 Peña-Moctezuma.

15 \*Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis, Centro de Enseñanza Investigación y Extensión  
16 en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional  
17 Autónoma de México, 04510, México, DF; \*\*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud  
18 Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México;  
19 \*\*\*Weill Cornell Medical College and Oswaldo Cruz Foundation / Brazilian Ministry of Health, Rua  
20 Waldemar Falcao, 121-Brotas 40.295-001-Salvador, BA, Brazil; †Facultad de Medicina Veterinaria y  
21 Zootecnia, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Teapa Km 25, la Huasteca  
22 2ª sección, Villahermosa, Tabasco, México; ‡Pathogen Biology Laboratory School of Life Sciences,  
23 University of Hyderabad, India Room No. LS-296, Central University P.O. Gachibowli, Hyderabad  
24 500046, India; °KIT Biomedical Research, KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical  
25 Institute) Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

1 **Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential**  
2 **impact on cattle production and public health.**

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 **Abstract**

2 Bovine leptospirosis causes high economic losses in cattle mainly due to reproductive failure and  
3 abortion, as well as representing public health risk. Since the last century, antibody titers against  
4 several *Leptospira* serovars have been detected by the microscopic agglutination test (MAT) in  
5 México. With the exception of very few cases, the presence of serovars causing leptospirosis in  
6 cattle and other animal species has not been substantiated by isolation in Mexico, and in such  
7 cases characterization had to be done abroad by complex and slow immunological approaches, by  
8 comparison with a number of reference strains. The present study was conducted to perform the  
9 molecular characterization of *Leptospira* isolates by multiple *locus* sequencing typing (MLST). A  
10 hundred and ninety seven sera and kidneys samples were collected immediately after slaughter,  
11 from grazing cattle coming from the south-eastern states of Mexico. Anti-*Leptospira* antibodies  
12 were detected by the MAT and kidneys were inoculated into EMJH and Fletcher specific media.  
13 A frequency of 60.4% (119 out of 197), with titers from 1:100 up to 1:3,200 was detected. Four  
14 isolates (2.03%), referred as CAL4, CAL6, CAL7 and MOCA45, were characterized by serology,  
15 ribotyping and MLST as *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa; *L. interrogans* serovar Hardjo; *L.*  
16 *santarosai* serovar Mini and *L. santarosai* serovar Tarassovi, respectively. With the exception of  
17 serovar Hardjo, the three other isolates belong to serovars and species not previously isolated in  
18 Mexico. These findings make it necessary to evaluate the potential distribution of such serovars  
19 among cattle and their role on animal production and public health.

20

21 **Key words:** *Leptospira*, Tarassovi, Mini, Grippotyphosa, CATTLE, ISOLATION, MLST.

22

23

24

## 1 **Resumen**

2 La leptospirosis bovina causa grandes pérdidas económicas a la ganadería por problemas  
3 reproductivos y también es un riesgo de salud pública. En México, desde el siglo pasado se ha  
4 registrado la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira* por la técnica de  
5 aglutinación microscópica (AM), en bovinos y otras especies animales. En muy pocos casos, la  
6 enfermedad fue demostrada por el aislamiento de *Leptospira*, y en tales casos, su caracterización  
7 se basó en métodos inmunológicos lentos que requirieron la comparación con cepas de referencia  
8 y que fueron realizados fuera de México. En el presente trabajo se realizó la caracterización  
9 molecular mediante la secuenciación de *locus* múltiples (MLST), de aislados de *Leptospira*  
10 obtenidos de riñones de bovinos recolectados en rastro, procedentes de las zonas Golfo y sur de  
11 México. Se obtuvieron muestras de suero y riñones de 197 bovinos para realizar la AM, y el  
12 cultivo en medios específicos. Se detectó una seropositividad del 60.4% (119 de 197), con títulos  
13 desde 1:100 hasta 1:3,200 y se obtuvieron cuatro aislados de *Leptospira* (2.03%), denominados  
14 CAL4, CAL6, CAL7 y MOCA45. Los aislados fueron caracterizados por serología,  
15 ribotipificación y MLST, como *L. kirschneri* serovariedad Grippytyphosa; *L. interrogans*  
16 serovariedad Hardjo; *L. santarosai* serovariedad Mini y *L. santarosai* serovariedad Tarassovi,  
17 respectivamente. A excepción de la serovariedad Hardjo, los aislados pertenecen a especies y  
18 serovariedades no aisladas anteriormente en la República Mexicana, esto sugiere la necesidad de  
19 evaluar su diseminación entre bovinos y su potencial efecto en la producción animal y en la salud  
20 pública.

21  
22 **Palabras clave:** *Leptospira*, Tarassovi, Mini, Grippytyphosa, BOVINOS, AISLAMIENTO,  
23 MLST.

24



## 1 **Introducción**

2 La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por especies y serovariedades patógenas  
3 del género *Leptospira*.<sup>1</sup> En el ganado bovino, es una enfermedad que afecta a las unidades de  
4 producción tanto lecheras como de carne.<sup>2</sup> La infección suele ser subclínica cuando es causada  
5 por serovariedades adaptadas al bovino como la serovariedad Hardjo, o bien por serovariedades  
6 no adaptadas, se pueden manifestar signos como fiebre, hematuria, hemoglobinuria, ictericia y  
7 muerte en los animales jóvenes; mientras que en hembras gestantes se pueden presentar abortos  
8 en cualquier estadio de la gestación, mortinatos, nacimiento de animales débiles, decremento en  
9 la producción láctea, agalactia transitoria, así como infertilidad.<sup>3</sup> Resulta difícil estimar las  
10 pérdidas económicas causadas por la leptospirosis, en gran parte por la dificultad para realizar el  
11 diagnóstico preciso y también debido a la presencia de otras enfermedades bacterianas, virales y  
12 parasitarias que pueden cursar con los mismos signos.<sup>4</sup>

13 Los primeros estudios de esta enfermedad en bovinos fueron realizados por Mikhin y Azinov en  
14 Rusia en 1935;<sup>5</sup> en Australia, en 1943 por Johnson,<sup>6</sup> y en Estados Unidos, en 1944 por Jungherr;<sup>7</sup>  
15 posteriormente se fueron identificando casos en prácticamente todo el mundo, donde las  
16 serovariedades más comúnmente registradas han sido Grippotyphosa, Pomona,<sup>8</sup>  
17 Icterohaemorrhagiae,<sup>9</sup> Hebdomadis,<sup>10</sup> Sejroe<sup>11</sup> y Hardjo.<sup>12</sup> Esta última serovariedad ha sido  
18 reconocida como de distribución mundial y la más importante en el ganado bovino y en otros  
19 rumiantes.<sup>13</sup> Además, en la serovariedad Hardjo se han reconocido dos subtipos clasificados en  
20 dos especies distintas: el subtipo Hardjobovis de *L. borgpetersenii* tiene importancia en Europa,  
21 América del Norte y Oceanía y el subtipo Hardjoprajitno de *L. interrogans* se encontró  
22 principalmente en el continente americano.<sup>14</sup>

23 En México, a la fecha sólo existe evidencia documentada de la presencia de *L. interrogans*  
24 serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno), la cual fue inicialmente aislada a partir de un feto de

1 bovino.<sup>15</sup> Debido a que el aislamiento de *Leptospira* es un proceso lento que puede consumir de  
2 semanas hasta meses, el diagnóstico rutinario se basa en la prueba serológica de aglutinación  
3 microscópica (AM), donde se detectan anticuerpos contra cepas de referencia, representantes de  
4 diferentes serogrupos.<sup>16</sup> En diferentes estudios serológicos en bovinos se han encontrado  
5 anticuerpos principalmente contra la serovariedad Hardjo, seguida de otras serovariedades, como  
6 Grippotyphosa, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Bratislava.<sup>17,18</sup> Lo anterior sólo refleja  
7 que los anticuerpos vacunales o de campo reaccionan contra las serovariedades utilizadas para el  
8 diagnóstico, pero existe un vacío de información sobre las serovariedades de *Leptospira* que son  
9 endémicas y que verdaderamente infectan a los bovinos en México, lo que requiere de su  
10 demostración mediante el aislamiento y caracterización. Se presume que otras especies y  
11 serovariedades de *Leptospira* pudieran estar causando enfermedad en los bovinos, pero que a la  
12 fecha no han sido identificadas y pudieran llegar a ser un problema económico en las unidades de  
13 producción, así como para la salud pública. Es conveniente conocer la distribución de las  
14 serovariedades que se encuentran en un área geográfica determinada, por lo que en el presente  
15 trabajo se realizó inicialmente un escrutinio serológico y bacteriológico, y posteriormente la  
16 caracterización inmunológica y molecular de los aislados para identificar otras especies y  
17 serovariedades de *Leptospira* presentes en las zonas del Golfo y sur de México.

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

## 1 **Material y Métodos**

### 2 *Recolección y procesado de muestras*

3 Se recolectaron muestras de riñón y sangre de 197 bovinos sacrificados para el abasto. Los  
4 riñones libres de la cápsula se colocaron en una solución de cloruro de benzalconio al 0.025% de  
5 5 a 10 minutos, para descontaminar su superficie. Posteriormente, se secaron con toallas de papel  
6 estériles y se les practicó de forma aséptica un corte longitudinal; se obtuvo entonces un  
7 macerado del interior del órgano con un rallador estéril, el cual se inoculó en los medios EMJH  
8 (Ellinghausen, McCullogh, Johnson y Harris) y Fletcher semisólidos, realizando tres diluciones  
9 décuples. Los cultivos se incubaron a 30°C durante tres meses y se revisaron semanalmente por  
10 microscopía de campo oscuro, para detectar formas bacterianas compatibles con leptospiras. Los  
11 sueros fueron clarificados por centrifugación a 903 g/5 min y se mantuvieron a -20 °C hasta  
12 realizar la prueba de AM.

13

### 14 *Detección de anticuerpos anti-Leptospira*

15 La prueba se realizó usando una dilución inicial del suero de 1:50 en solución amortiguadora de  
16 fosfatos (SAF, pH 7.2 a 7.4) y tomando como punto de corte para reacciones positivas la dilución  
17 de 1:100 (16). Se utilizaron 12 cepas de referencia de las serovariedades Autumnalis, Bataviae,  
18 Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona,  
19 Pyrogenes y Tarassovi cultivadas en medio EMJH líquido de 7 a 14 días, las cuales fueron  
20 donadas por el WHO/FAO/OIE-Collaborating Centre for Reference and Research on  
21 Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region, de Brisbane, Queensland, Australia.

22

### 23 *Identificación serológica de los aislados*

1 Se produjeron sueros inmunes en conejos de 1.5 kg de peso a partir de los aislados cultivados en  
2 medio de Fletcher de 7 a 10 días a 30 °C. Los cultivos se recolectaron del anillo de desarrollo  
3 conocido como zona de Dinger, se inactivaron a 56 °C durante media hora y posteriormente, se  
4 inocularon por vía intravenosa en dosis de 1, 2, 4, y 6 ml, con una semana de diferencia entre  
5 cada inóculo.<sup>16</sup> Los conejos que alcanzaron títulos séricos mínimos de 1:12,800 contra la cepa  
6 homóloga con la que fueron inoculados, fueron anestesiados con ketamina (60 mg/kg) y  
7 sangrados en blanco por punción cardíaca. Los sueros se obtuvieron por centrifugación a 903 g/5  
8 min, distribuidos en volúmenes de 1.5 ml y congelados a -20°C hasta su análisis. La prueba de  
9 AM se realizó utilizando el protocolo previamente descrito por Myers,<sup>16</sup> con los sueros inmunes y  
10 las cepas de referencia.

11

#### 12 *Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa*

13 Los aislados adaptados a condiciones de laboratorio fueron cultivados en 100 ml de medio  
14 líquido EMJH y centrifugados a 10,000 g/30 min. La extracción de ADN se realizó por el método  
15 de tiocianato de guanidina y cloroformo-álcohol isoamílico descrito por Boom *et al.*<sup>19</sup> Con la  
16 finalidad de confirmar el origen de los aislados, se realizó la prueba de reacción en cadena de la  
17 polimerasa (PCR), con los iniciadores G1 : G2 que amplifican ADN de serovariedades de  
18 diferentes especies patógenas de *Leptospira*, y con B64-I : B64-II, iniciadores que amplifican  
19 serovariedades de *L. kirschneri*.<sup>20</sup> También se utilizaron los iniciadores MILL1801 y MILL1802,  
20 diseñados especialmente para amplificar un fragmento de ADN de 1,289 pb, de una región del  
21 *loci rfb* codificante de enzimas para la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS), de serovariedades  
22 no patógenas.<sup>21</sup> Los amplicones resultantes de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa

1 teñidos con bromuro de etidio, para obtener un registro fotográfico mediante un digitalizador de  
2 imágenes ‡(Gel Logic 200, Kodak®).

3

#### 4 *Identificación genética por secuenciación del gen rrs2 (16S ribosomal)*

5 El gen 16S rRNA de los aislados fue secuenciado en los laboratorios del instituto Fio-Cruz,  
6 Salvador, Brasil; las secuencias fueron remitidas electrónicamente a nuestro laboratorio donde  
7 fueron editadas, ordenadas y analizadas con el programa §Sequencher®, versión 4.6. Se  
8 identificaron las secuencias relacionadas en las bases de datos utilizando el Basic Local  
9 Alignment Search Tool (BLASTn), disponible en la red.<sup>22</sup> El alineamiento de las secuencias y el  
10 árbol filogenético resultante fueron construidos utilizando el método de Neighbor-Joining con  
11 2,000 réplicas con el modelo de Kimura de 2-parámetros, en el programa Molecular Evolutionary  
12 Genetics Analysis (MEGA), versión 4.0.<sup>23,24</sup>

13 Por otro lado se utilizó el primer esquema de MLST, descrito por Ahmed *et al.*,<sup>25</sup> diseñado para  
14 la tipificación de cepas de 6 especies patógenas de *Leptospira*, el cual está fundamentado en el  
15 análisis de las secuencias de alelos de los genes *adk*, *secY*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41* y *rrs2*. Las PCR  
16 se realizaron de acuerdo con las siguientes condiciones: 200 µM de dNTP's, 0.2 U de Taq  
17 Polimerasa, 5µl de amortiguador 10 X \*\* (Roche®), 10 pmol de iniciadores (sintetizados en el  
18 Instituto de Biotecnología, UNAM) y 30 a 60 ng de ADN, en un volumen total de reacción de 50  
19 µl. Para el proceso se utilizó un termociclador (Perkin Elmer 2400 PCR System®), con los  
20 parámetros de: desnaturalización inicial a 95°C/5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización  
21 (94°C/30 seg), alineación (58°C/45 seg) y extensión (72°C/45 seg), y una extensión final de 7  
22 min/72°C. Para visualizar los productos se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%

---

‡ Carestream Health, Inc. Nueva York, Estados Unidos de América

§ Gene Codes Corporation. Brighton, Inglaterra.

\*\* Roche Applied Science. Mannheim, Alemania

1 teñidos con bromuro de etidio. La purificación de los amplicones antes de su secuenciación, se  
2 realizó utilizando columnas para purificar productos de PCR <sup>††</sup>Montagé®. Los productos de PCR  
3 fueron secuenciados por la empresa MacroGen Inc., en Seúl, Corea del Sur. Las secuencias  
4 remitidas electrónicamente fueron editadas y analizadas con el programa Sequencer®, versión  
5 4.6. Para designar el número de alelos encontrados por gen, las secuencias obtenidas de cada  
6 aislado fueron comparadas con una base de datos proporcionada por Niyaz Ahmed *et al.*,<sup>25</sup> con el  
7 programa DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution).<sup>26</sup> Para realizar el  
8 análisis filogenético por alelos se utilizó el programa START2 (Sequence Type Analysis and  
9 Recombinational Tests, Versión 2). Finalmente, el análisis filogenético se corroboró con las  
10 secuencias de cada gen concatenadas en una sola, con el programa MEGA (Molecular  
11 Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.2.<sup>24</sup>

12

---

<sup>††</sup> Millipore Corporation. MA, Estados Unidos de América

## 1 **Resultados**

### 2 *Aglutinación microscópica de los sueros de bovino.*

3 Se detectó una frecuencia de sueros positivos de 60.40% en los bovinos muestreados (119 de  
4 197) mediante AM, donde las serovariedades de *Leptospira* detectadas con mayor frecuencia  
5 fueron: Hardjo 39.90% (61/197), Tarassovi 7.10% (14/197), Pomona 3.04% (6/197),  
6 Grippotyphosa 1.52% (3/197), Icterohaemorrhagiae 1.52% (2/197), Bratislava 1.52% (2/197) y  
7 Canicola 0.50% (1/197).

8

### 9 *Aislamiento e identificación serológica de los aislados.*

10 Se obtuvieron cuatro aislados (2.3%), a partir de los riñones de bovino, entre las semanas doce y  
11 trece de incubación en medio EMJH. Los aislados se denominaron CAL4, CAL6, CAL7 y  
12 MOCA45. Al realizar la identificación con el suero inmune homólogo, el suero del aislado CAL4  
13 reaccionó con un título de 1:25,600 contra la serovariedad Grippotyphosa cepa Moskva V; el  
14 aislado CAL6 reaccionó con un título de 1:25,600 contra la serovariedad Hardjo subtipo  
15 Hardjoprajitno; el aislado CAL7 reaccionó con un título de 1:12,800 contra la serovariedad Mini  
16 cepa Sari y el aislado MOCA45 reaccionó con un título de 1:12,800 contra la serovariedad  
17 Tarassovi cepa Perepelitsin (Cuadro 1).

18

### 19 *Identificación molecular de los aislados.*

20 La PCR mostró a los cuatro aislados como leptospiras patógenas. CAL4 amplificó el fragmento  
21 de ADN de 565 pb con los iniciadores B64-I : B64-II, mientras que los aislados CAL6, CAL7 y  
22 MOCA45 amplificaron el fragmento de ADN de 283 pb con los iniciadores G-1 : G-2. Ninguno

1 de los aislados amplificó fragmentos de ADN con los iniciadores MILL1801 y MILL1802,  
2 específicos para identificar leptospiros saprófitas (Figura 1).

3 De acuerdo con el análisis filogenético del gen *rrs2*, los aislados fueron identificados como tres  
4 diferentes especies de *Leptospira*. Comparando las secuencias con mayor similitud con el  
5 programa Megablast ([www.megablast.ncbi.org](http://www.megablast.ncbi.org)), se encontró que CAL4 tiene 99% de identidad  
6 con otras secuencias pertenecientes a *L. kirschneri*; CAL6 tiene 99% de identidad con cepas de *L*  
7 *interrogans*; CAL7 y MOCA45 tienen 99% de identidad con cepas de *L. santarosai*. La relación  
8 filogenética entre éstas se muestra en la Figura 2.

9 La identificación por MLST se realizó mediante la amplificación por PCR, de fragmentos  
10 internos de los seis genes, y comparando con el esquema previamente propuesto todos los  
11 amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones. CAL6 mostró el tipo de secuencia 254  
12 que lo identifica como *L. interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno. Por el  
13 contrario, las cepas CAL4, CAL7 y MOCA45 tienen tipos de secuencias no registrados  
14 anteriormente en ninguna parte del mundo (Cuadro 2).

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24



## 1 **Discusión**

2 La presentación clínica de leptospirosis en bovinos está influida por la serovariedad y la especie  
3 infectante. Existen serovariedades adaptadas al bovino, que causan enfermedad esporádicamente,  
4 serovariedades no adaptadas que comúnmente causan brotes de presentación aguda, y otras  
5 serovariedades de presentación rara en los bovinos en las cuales se desconoce el curso de la  
6 enfermedad.<sup>27</sup> Por lo tanto, el control de la leptospirosis depende, en parte, de la detección  
7 serológica de las serovariedades prevalentes en la región y mejor aún, de su detección mediante  
8 el aislamiento. En el presente estudio se realiza la primera descripción de la caracterización  
9 molecular de cuatro aislados de *Leptospira* de las especies *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L.*  
10 *santarosai* (dos), aisladas a partir de bovinos en México. La clasificación genética de estos  
11 aislados se llevo a cabo mediante dos métodos, por secuenciación del gen *rrs2* (16S ribosomal)<sup>28</sup>  
12 y por la tipificación mediante la secuenciación de *locus* múltiples (MLST).<sup>25</sup>

13 Es sabido que Hardjo es una serovariedad adaptada al bovino, por lo que es posible que infecte a  
14 esta especie animal sin producir la enfermedad, sólo en ciertas condiciones de estrés causa  
15 enfermedad reproductiva en forma esporádica.<sup>29</sup> La serovariedad Hardjo incluye dos subtipos que  
16 se encuentran en dos especies diferentes, pero que son serológicamente indistinguibles.<sup>30</sup> *L.*  
17 *borgpetersenii* serovariedad Hardjo (subtipo Hardjobovis), ha sido aislada y registrada como la  
18 serovariedad más común entre las poblaciones de ganado bovino en todo el mundo. Por esta  
19 razón y a pesar de no haber sido aún aislada en México, se intuye que está presente en el país  
20 puesto que se ha identificado su presencia en países exportadores de ganado a México  
21 (<http://www.siap.gob.mx>).<sup>31-33</sup> En el presente trabajo, se ha confirmado por medio del  
22 aislamiento la presencia de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (subtipo Hardjoprajitno) (aislado  
23 CAL6), la cual es común en el continente americano<sup>27</sup> y ha sido previamente aislada en México  
24 a partir de un feto bovino.<sup>15</sup>

1 Estudios del *locus rfb* para la biosíntesis del LPS sugieren que el subtipo Hardjoprajitno  
2 evolucionó a partir de un ancestro de la serovariedad Copenhageni, el cual a lo largo del tiempo  
3 adquirió genes del *locus rfb* a partir del subtipo Hardjobovis; esto le permitió a dicho ancestro de  
4 alguna manera adaptarse al huésped bovino y dar origen así al subtipo Hardjoprajitno.<sup>34</sup>

5 Algunas otras serovariedades como Pomona, Grippytyphosa, Bratislava e Icterohaemorrhagiae,  
6 son serovariedades no adaptadas al bovino, que causan leptospirosis en su forma aguda.<sup>29</sup> En  
7 México se ha registrado ampliamente la presencia de anticuerpos contra estas serovariedades, sin  
8 embargo, no existen a la fecha datos de su aislamiento a partir de muestras clínicas de  
9 bovinos.<sup>17,18</sup> Por ello, es necesario identificar las serovariedades, adaptadas o no adaptadas al  
10 bovino, que pudieran asociarse con enfermedad aguda. En el presente trabajo, de acuerdo con los  
11 análisis serológico (AM) y moleculares (secuenciación de *rrs2* y MLST), se identificó al aislado  
12 CAL4 como *L. kirschneri* serovariedad Grippytyphosa. La tipificación por MLST de CAL4  
13 mostró un nuevo tipo de secuencia: ST259 (Cuadro 2), no registrado anteriormente en ninguna  
14 otra serovariedad de *Leptospira* y que filogenéticamente evolucionó a partir de la serovariedad  
15 Grippytyphosa cepa Moskva V.

16 En diferentes países del mundo se ha registrado la infección en bovinos con serovariedades  
17 atípicas, que se presentan en forma endémica en una región, pero no se conoce el impacto de  
18 dichas serovariedades en la producción y en la salud de los animales y del hombre, así como la  
19 probable fuente de infección, tal es el caso de las serovariedades Kennewicki en Chile,<sup>35</sup> Zanoni  
20 en Australia,<sup>36</sup> Fugis y Zimbabwe en Zimbabwe,<sup>37</sup> y Guaricura en Brasil.<sup>38</sup> En el presente trabajo  
21 se informa sobre el aislamiento de serovariedades que no son registradas comúnmente en  
22 bovinos, como son los casos de los aislados CAL7 de la serovariedad Mini (ST260) y MOCA45  
23 de la serovariedad Tarassovi (ST261), ambos aislados de la especie *L. santarosai*. La  
24 serovariedad Mini ha sido registrada en las especies *L. interrogans*<sup>39</sup> y *L. borgpetersenii*,<sup>40</sup> pero

1 Mini de *L. santarosai* no se había encontrado en bovinos, por otro lado, la serovariedad Tarassovi  
2 de la misma especie, *L. santarosai*, ha sido aislada previamente de bovinos en Centro y  
3 Sudamérica, pero no en México, hasta este informe.

4 De acuerdo con los resultados de este trabajo, no existe una relación absoluta entre la serología y  
5 el aislamiento; de los cuatro bovinos de los que se obtuvieron los aislados, sólo en el que se aisló  
6 CAL6 se observaron títulos de anticuerpos de 1:200 hacia la misma serovariedad, mientras que  
7 los otros tres bovinos (CAL4, CAL7, MOCA45) no mostraron títulos de anticuerpos contra  
8 ninguna serovariedad. En cuanto a la frecuencia de positivos por serología, la serovariedad  
9 Hardjo fue la más frecuentemente detectada en el presente estudio, pero se obtuvieron aislados de  
10 las serovarietades Tarassovi y Mini que no mostraron tener importancia por serología utilizando  
11 cepas de referencia. Es generalmente conocido que la sensibilidad de la prueba de AM aumenta  
12 cuando se incluyen las cepas aisladas (autóctonas) de la región geográfica.<sup>16</sup> Al utilizar los  
13 aislados autóctonos aumenta la frecuencia de positivos por AM.<sup>17, 41</sup> Por lo anterior y con base en  
14 los resultados mostrados en este estudio, se sugiere incluir los aislados CAL4, CAL6, CAL7 y  
15 MOCA45 en posteriores estudios serológicos de bovinos, además de realizar la búsqueda de éstas  
16 y otras serovarietades que prevalecen en la región, mediante el aislamiento del agente etiológico,  
17 y no sólo con base en los resultados de serología.

18

1 **Agradecimientos**

2 Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos UNAM/PAPIIT IN222806 e  
3 IN221409; SEP-CONACyT 83123 y el MACROPROYECTO No. 7 de la Universidad Nacional  
4 Autónoma de México. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la  
5 beca No. 165530 para estudios de posgrado de Carlos Alfredo Carmona Gasca.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 1 **Referencias**

- 2 1. ADLER B, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol  
3 2010; 140: 287-296.
- 4 2. AMATREDJO A, CAMPBELL RSF. Bovine leptospirosis. Vet Bull 1975; 43: 875-891.
- 5 3. ELLIS WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet Clin North Am Food Anim  
6 Pract 1994; 10: 463-478.
- 7 4. ELLIS WA, LITTLE TWA. The present state of leptospirosis diagnosis and control. In: Ellis  
8 WA, Little TWA, editors. Current topics in veterinary medicine and animal science. Dordrecht  
9 Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1986: 13-21.
- 10 5. MIKHIN NA, AZINOV SA. Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus. Sovyet Vet  
11 1935; 10: 23-27 (artículo original inexistente, un resumen en: Vet Bull 1937; 7:419).
- 12 6. JOHNSON D. Epidemiology of Weil's disease. Br Med J 1943; 2: 659.
- 13 7. JUNGHERR E. Bovine leptospirosis. J Am Vet Med Assn 1944; 105: 276-281.
- 14 8. BRYAN NS, BOLEY LE. Studies on leptospirosis in domestic animals. IV. Survival of  
15 *Leptospira pomona* in bovine semen extender. Mich State Univ Vet 1955; 16: 27-29.
- 16 9. ELLIS WA, NEILL SD, O'BRIEN JJ, HANNA J, BRYSON DG. The isolation of a strain of  
17 *Leptospira* serogroup icterohaemorrhagiae from an aborted bovine foetus. Br Vet J 1977; 133:  
18 108-109.
- 19 10. THIERMANN A. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of  
20 the Hebdomadis serogroup. Am J Vet Res 1982; 43: 780-784.
- 21 11. MICHNA SW, CAMPBELL RSF. The isolation of *Leptospira sejroe* from the kidneys of  
22 aborting cattle. Vet Rec 1969; 84: 83-86.
- 23 12. ROTH EE, GALTON MM. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in  
24 Louisiana. Am J Vet Res 1960; 21: 422-427.

- 1 13. AYANEGUI-ALCÉRRECA MA, WILSON P, MACKINTOSH CG, COLLINS-EMERSON  
2 JM, HEUER C, MIDWINTER AC *et al.* Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review.  
3 N Z Vet J 2007; 55: 102-108.
- 4 14. ZUERNER RL, ELLIS WA, BOLIN CA, MONTGOMERY JM. Restriction fragment length  
5 polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates  
6 from different geographical locations. J Clin Microbiol 1993; 31: 578-583.
- 7 15. SALOMÓN SA, ZERMEÑO G, MOLES CLP. Aislamiento de leptospiras a partir de  
8 animales de granja. Informe de Servicio Social. México DF: Universidad Autónoma  
9 Metropolitana, 1988.
- 10 16. MYERS M. Manual para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis OPS. Centro  
11 Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1985. Nota  
12 técnica No 30.
- 13 17. LUNA AMA, MOLES CLP, GAVALDÓN RD, VÁSQUEZ NC, SALAZAR GF. Estudio  
14 retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones  
15 ecológicas. Rev Cubana Med Trop 2005; 57: 28-31.
- 16 18. CHÁVEZ TR. Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de  
17 leptospirosis en animales, de 1989 a 2004 en el departamento de Microbiología e Inmunología,  
18 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM (tesis de licenciatura). México DF:  
19 Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- 20 19. BOOM R, SOL CJ, SALIMANS MM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PM,  
21 VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin  
22 Microbiol 1990; 28: 495-503.

- 1 20. GRAVEKAMP C, VAN DE KEMP H, FRANZEN M, CARRINGTON D, SCHOONE GJ,  
2 VAN EYS GJ *et al.* Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets  
3 of primers. J Gen Microbiol 1993; 139: 1691-1700.
- 4 21. MENA BR. Análisis *in silico* de los genes *gspD<sub>L</sub>* y *gspE<sub>L</sub>*, del sistema de secreción tipo II de  
5 *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (tesis de maestría). México DF: Universidad Nacional  
6 Autónoma de México, 2006.
- 7 22. ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment  
8 search tool. J Mol Biol 1990; 215:403-410.
- 9 23. SATOU N, NEI M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing  
10 phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987; 4:406-425.
- 11 24. TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics  
12 Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596-1599.
- 13 25. AHMED N, DEVI SM, VALVERDE M DE L, VIJAYACHARI P, MACHANG'U RS,  
14 ELLIS WA *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic  
15 classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 23: 5-28.
- 16 26. XIA X, XIE Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J Hered 2001;  
17 92: 371-373.
- 18 27. HANSON LE. Bovine leptospirosis. J Dairy Sci. 1976; 59:1166-70
- 19 28. PEROLAT P, MERIEN F, ELLIS WA, BARANTON G. Characterization of *Leptospira*  
20 isolates from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site  
21 polymorphisms. J Clin Microbiol 1994; 32: 1949-1957.
- 22 29. ALONSO-ANDICOBERRY C, GARCÍA-PEÑA FJ, ORTEGA-MORA LM. Epidemiología,  
23 diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest Agr: Prod Sanid Anim 2001;  
24 16: 205-226.

- 1 30. RAMADASS P, MARSHALL RB, JARVIS BDW. Species differentiation of *Leptospira*  
2 *interrogans* serovar Hardjo strain Hardjobovis from strain Hardjoprajitno by DNA slot blot  
3 hybridisation. J Res Vet Sci 1990; 49: 194-197.
- 4 31. ALT DP, ZUERNER RL, BOLIN CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle  
5 infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. J Am Vet Med Assoc 2001; 219: 636-  
6 639.
- 7 32. THIERMANN AB, HANDSAKER JW, FOLEY JW, WHITE FH, KINGSCOTE BF.  
8 Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe  
9 by restriction endonuclease analysis. Am J Vet Res 1986; 47: 61-66.
- 10 33. THORNLEY CN, BAKER PM, WEINSTEIN P, MAAS EW. Changing epidemiology of  
11 human leptospirosis in New Zealand. Epidemiol Infect 2002; 128:29-36.
- 12 34. DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A, BULACH D, KALAMBAHETI T, ADLER B.  
13 Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo:  
14 *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype  
15 Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999; 177: 319-326.
- 16 35. ZAMORA J, RIEDEMANN S, MONTECINOS MI, CABEZAS X. Aislamiento en Chile de  
17 *Leptospira interrogans* serovares Hardjo y Kennewicki en bovinos aparentemente sanos. Arch  
18 Med Vet. 1991; 23: 131-135.
- 19 36. SMITH CR, CORNEY BG, MCGOWAN MR, MCCLINTOCK CS, WARD W, KETTERER  
20 PJ. Amoxicillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with  
21 *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Aust Vet J 1997; 75: 818-821.
- 22 37. FERESU SB, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ. DNA relatedness of *Leptospira* strains  
23 isolated from beef cattle in Zimbabwe. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 1111-1117.



- 1 38. VASCONCELLOS SA, OLVEIRA JCF, MORAIS ZM, BARUSELLI PS, AMARAL R,  
2 PINHEIRO SR *et al.* Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes  
3 (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, Sao Paulo, Brazil. Braz J Microbiol 2001; 32: 298-300.
- 4 39. TORTEN M, BIRNBAUM S, KLINGBERG MA, SHENBERG E. Epidemiologic  
5 investigation of an outbreak of leptospirosis in the Upper Galilee, Israel. Am J Epidemiol. 1970;  
6 91:52-8
- 7 40. VEDHAGIRI K, NATARAJASEENIVASAN K, PRABHAKARAN SG, SELVIN J,  
8 NARAYANAN R, SHOUCHE YS *et al.* Characterization of *Leptospira borgpetersenii* isolates  
9 from field rats (*Rattus norvegicus*) by 16S rRNA and *lipL32* gene sequencing. Braz J Microbiol  
10 2010; 41: 150-157.
- 11 41. MOLES CLP, CISNEROS PMA, GAVALDÓN RD, ROJAS SN, TORRES BJI. Estudio  
12 serológico de leptospirosis bovina en México. Rev Cubana Med Trop 2002; 54: 24-27.
- 13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

1

Cuadro 1

Cepas de referencia			Títulos de anticuerpos obtenidos con suero in mune enfrentado a las cepas de referencia			
Serogrupo	Serovariedad	Cepa	CAL4	CAL6	CAL7	MOCA 45
Grippotyphosa	Canalzonae	CZ 188	1:200	-	-	-
Grippotyphosa	Valbuzzi	Duister	1:12,800	-	-	-
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Mandemarkers	1:12,800	-	-	-
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	1:25,600	-	-	1:50
Grippotyphosa	Muelleri	RM 2	1:12,800	-	-	-
Mini	Mini	Sari	-	1:400	1:12,800	-
Mini	Georgia	LT 117	-	1:100	1:3,200	-
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	-	1:25,600	1:3,200	-
Sejroe	Sejroe	M84	-	1:6,400	1:800	-
Sejroe	Wolffi	3705	-	1:400	1:400	1:50
Shermani	Shermani	1342 K	-	-	-	1:800
Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	-	-	-	1:12,800

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

1 Cuadro 1. Identificación serológica de los aislados obtenidos en el presente estudio.

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21



1

2 **Figura 1**

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 Figura 1. Identificación de los aislados como leptospiras patógenas por PCR. Línea 1: Marcador  
2 de Peso Molecular; Líneas 2, 3, 4: aislado CAL4; Líneas 5, 6, 7: aislado CAL6; Líneas 8, 9, 10:  
3 aislado CAL7; Líneas 11, 12, 13: MOCA45; Líneas 14, 15, 16 controles positivos. Líneas 2, 5, 8,  
4 11, 14: reacciones con los indicadores B64-I : B64-II; Líneas 3, 6, 9, 12, 15: reacciones con los  
5 iniciadores G-1 : G-2; Líneas 4, 7, 10, 13, 16: reacciones con los iniciadores MILL1801 y  
6 MILL1802.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

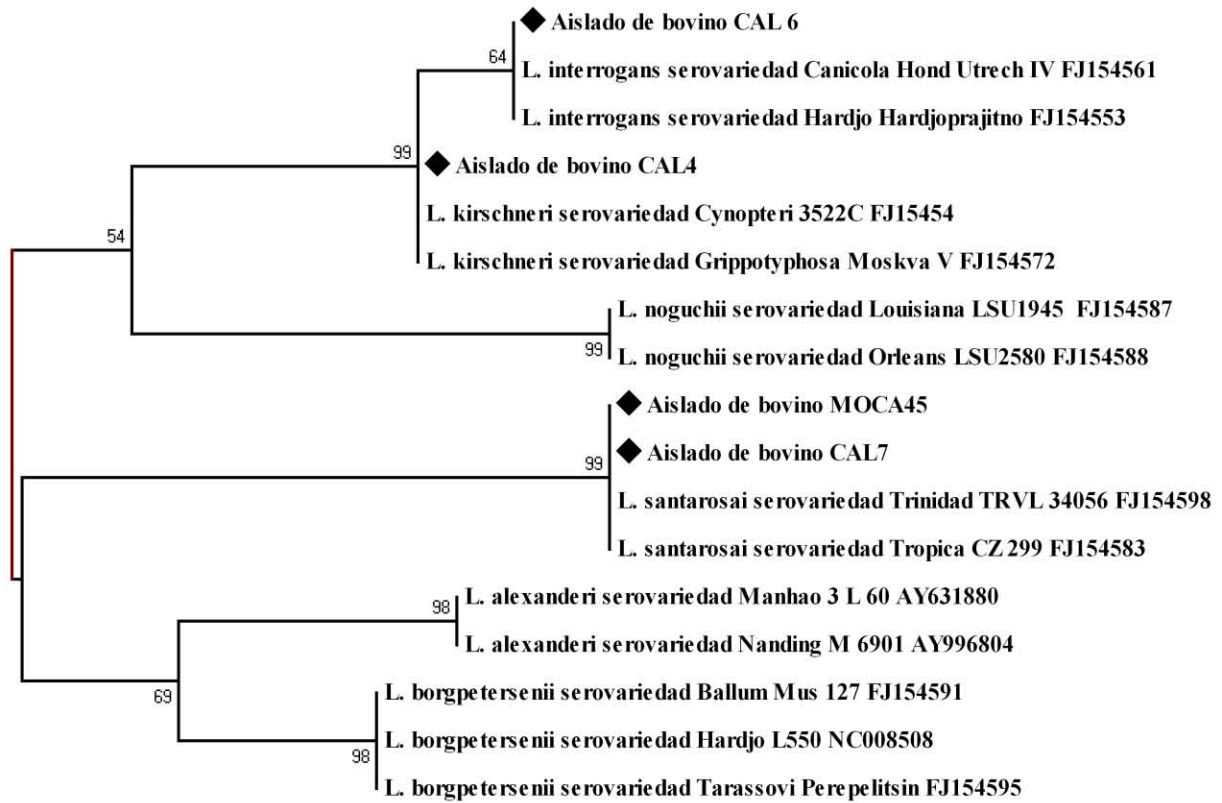
20

21

22

23

24



$\frac{H}{0.0001}$

1

2 Figura 2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

Figura 2. Ribotipificación e identificación de la especie a la que pertenecen los aislados de bovino obtenidos en el presente estudio. El filograma muestra el análisis de las secuencias del gen *rrs2* de los aislados, con las secuencias de cepas de referencia encontradas en el Genebank (con número de acceso).

1

Cuadro 2

Serogrupo	Especie	Serovariedad	Cepa/aislado	<i>adk</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>secY</i>	ST
Grippotyphosa	<i>L.kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	28	119	18	120	66	9	253
Grippotyphosa	<i>L.kirschneri</i>	Grippotyphosa	CAL4	28	120	63	122	66	43	259
Sejroe	<i>L.interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	5	2	2	3	2	113	254
Sejroe	<i>L.interrogans</i>	CAL6	CAL6	5	2	2	3	2	113	254
Pyrogenes	<i>L.santarosai</i>	Prinkestown	TRVL 112499	61	45	34	70	44	72	160
Pyrogenes	<i>L.santarosai</i>	Alexi	HS 616	60	45	22	69	19	71	159
Tarassovi	<i>L.santarosai</i>	Bakeri	LT 79	70	61	22	54	18	77	169
Mini	<i>L.santarosai</i>	Mini	CAL7	117	45	34	79	18	116	260
Tarassovi	<i>L.santarosai</i>	Tarassovi	MOCA 45	50	45	22	74	18	117	261

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19



- 1 Cuadro 2. Perfil alélico y tipo de secuencia encontrado en los diferentes aislados de *Leptospira*.
- 2 El número de alelo por gen fue obtenido de la comparación de las secuencias en la base de datos
- 3 proporcionada por Ahmed *et al.*, 2006. También se muestran los alelos más relacionados
- 4 obtenidos a partir de las cepas de referencia.

1 **CAPÍTULO 6.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11 **COMPARISON OF TWO MULTILOCUS SEQUENCE TYPING**  
12 **SCHEMES AND THE INCLUSION OF *gspD* ON**  
13 **CHARACTERIZATION OF *Leptospira* ISOLATES.**

14

15

16

17 Carmona-Gasca CA<sup>1</sup>, León Lara L<sup>2</sup>, Castillo Sánchez LO<sup>1</sup>, Luna  
18 Alvarez MA<sup>3</sup>, Torres Barranca JI<sup>4</sup>, Vado Solis I<sup>5</sup>, Ko AL<sup>6</sup>, Harskeerl  
19 R<sup>7</sup>, Ahmed N<sup>8</sup>, De la Peña-Moctezuma A<sup>1</sup>.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 Comparison of two Multilocus sequence typing schemes and the inclusion of  
2 gspD on characterization of *Leptospira* isolates.

3

4

5 Carmona-Gasca CA<sup>1</sup>, León Lara L<sup>2</sup>, Castillo Sánchez LO<sup>1</sup>, Luna Alvarez MA<sup>3</sup>,  
6 Torres Barranca JI<sup>4</sup>, Vado Solis I<sup>5</sup>, Ko AL<sup>6</sup>, Harskeerl R<sup>7</sup>, Ahmed N<sup>8</sup>, De la  
7 Peña-Moctezuma A<sup>1</sup>.

8 <sup>1</sup>Grupo de Investigación en Leptospira y Leptospirosis, CEIEPAA, Facultad de  
9 Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.  
10 Email [delapema@unam.mx](mailto:delapema@unam.mx), [carmonagasca@yahoo.com.mx](mailto:carmonagasca@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Centro de  
11 Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina  
12 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Email  
13 [derbyvw@yahoo.com.mx](mailto:derbyvw@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en  
14 Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales  
15 Agrícolas y Pecuarias. Email [luamvet@hotmail.com](mailto:luamvet@hotmail.com). <sup>4</sup>Facultad de Medicina  
16 Veterinaria de la Universidad Autónoma Metropolitana. <sup>5</sup>Facultad de Medicina,  
17 Universidad Autónoma de Yucatán. Email [vsolis@tunku.uady.mx](mailto:vsolis@tunku.uady.mx). <sup>6</sup>Medicine,  
18 Weil Medical College, Cornell University and Oswaldo Cruz  
19 Foundation/Brazilian Ministry of Health. Email [alk2001@med.cornell.edu](mailto:alk2001@med.cornell.edu). <sup>7</sup>KIT  
20 Biomedical Research, KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen/Royal Tropical  
21 institute), Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands. Email  
22 [r.harlskeerl@kit.nl](mailto:r.harlskeerl@kit.nl). <sup>8</sup>Pathogen Biology Laboratory School of Life Sciences,  
23 University of Hyderabad, India Room No. LS-296, School of Life Sciences,

1 Central University P.O. Gachibowli, Hyderabad 500046, India. Email  
2 [niyazsl@uohyd.ernet.in](mailto:niyazsl@uohyd.ernet.in), [ahmed.nizi@gmail.com](mailto:ahmed.nizi@gmail.com)

3

4

5

## 6 **Summary**

7 MLST is a powerful and straight forward tool in characterization of organisms of  
8 clinical importance including pathogenic *Leptospira* isolates. Two schemes have  
9 taken importance for typing isolates around the world, and an international  
10 agreement might be in scope in near future. The type two secretion system has  
11 been previously detected in different *Leptospira* serovars and the putative  
12 encoded secretine (*gspD*) was revealed in the available *Leptospira* genomes  
13 databases. Previous *in silico* comparison of *gspD* with other genes used for  
14 MLST indicated variability enough to be used for MLST purposes. The aims of  
15 this study were to analyse the distribution of *gspD* genotypes in a collection of  
16 reference strains and eighteen Mexican isolates from different sources and its  
17 suitability for MLST and and in a second stage to compare the two available  
18 MLST proposals for *Leptospira*. A 544 bp *gspD* fragment was amplified by PCR  
19 with a specific primer set. Analysis of the sequence showed thirteen different  
20 *gspD* genotypes among the strains used for amplification, the number of alleles  
21 and the polymorphic sequence showed a higher variability than other genes  
22 used for MLST, showing *gspD* provided high resolution for discrimination of  
23 strains to be considered for an interspecies MLST scheme.

24

## 1 **Background/Introduction**

2 The genus *Leptospira* is a genetically diverse cluster of organisms; there are  
3 currently fourteen species pathogenic and six non-pathogenic species, including  
4 more than 300 serovars morphologically indistinguishable. (Levett *et al.*, 2006),  
5 (Zakeri *et al.*, 2010), (Faine *et al.*, 1999), (Levett P, 2001). Pathogenic serovars  
6 causes leptospirosis, one of the most widespread zoonotic diseases in the  
7 world, very often affecting people with agriculture related occupations, as well  
8 as domestic and wild animals. It is estimated that the infection rate is 10 to 100  
9 cases per 100,000 habitants, where the number of cases is increased in  
10 countries with tropical climate (WHO, 2000). The disease has many clinical  
11 manifestations that make difficult its accurate diagnosis. The fatal cases usually  
12 occur in regions where new serovars are introduced and are not adapted to  
13 local hosts. Genetic diversity, presence of reservoirs such as rats, severe  
14 clinical presentation and fatality, make leptospirosis a diseases where  
15 laboratory diagnosis is crucial for opportune treatment and prevention ( Ko *et*  
16 *al.*, 2009; Adler and De la Peña-Moctezuma, 2010).

17 Isolation and characterization provides reliable information about the causative  
18 agent of the disease (WHO, 2003). Characterization of *Leptospira* isolates has  
19 been performed traditionally by cross-adsorption agglutination assays and other  
20 methods such as: Restriction fragment length polymorphism (Brown and  
21 Levett,1997), pulsed field gel electrophoresis (Herrmann *et al.*, 1992),  
22 differential PCR (Perolat *et al.*, 1994), Fluorescent amplification fragment length  
23 polymorphism (Vijayachari *et al.*, 2004), Analysis of Variable Number of  
24 Tandem Repeats (Majed *et al.*, 2005), and more recently the Multi *Locus*

1 Sequencing Typing (MLST). MLST is a promising assay for characterization of  
2 *Leptospira* isolates as demonstrated in other organisms. MLST is highly robust,  
3 portable, non-ambiguous technique, which allows the identification at serovar  
4 level of *Leptospira* isolates (Ahmed *et al.*, 2006). The first proposed MLST  
5 scheme to be applied for typing of *Leptospira* strains included the *adk*, *icdA*,  
6 *secY*, *lipL32*, *rrs2* and *lipL41* genes to classify 41 reference strains and 79  
7 isolates from the six *Leptospira* species containing the highest number of  
8 pathogenic serovars. In such a scheme the last three genes showed medium  
9 discriminatory power (Ahmed *et al.*, 2006). In that publication the sequence  
10 types (ST) for each serovar were not assigned. Technically, the inclusion of a  
11 highly variable set of genes would improve the robustness of the technique, for  
12 that reason it might be advisable to replace the genes that have the lowest  
13 variability for those conserved house keeping genes not subjected to  
14 environmental stress that show high variability. In a second MLST proposal by  
15 Thaipadungpanit *et al.*, (2007), the genes chosen were *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*,  
16 *mreA*, *fadD* and *glmU*. They reported the same ST in isolates coming from  
17 humans or rodents in the same geographic region, assuming the infection to be  
18 caused by the same strain of *L. interrogans* (Thaipadungpanit *et al.*, 2007).  
19 Such a scheme is available at (<http://leptospira.mlst.net/>), however it is limited  
20 for discrimination of *L. interrogans* and some *L. kirschneri* strains. The ideal  
21 MLST scheme should provide discrimination beyond the species level and be  
22 valid for all *Leptospira* serovars. It has been shown recently, that *ligB*, *secY*,  
23 *lipL41* and *rpoB* are potential genes to improve a MLST scheme (Cerqueira *et*  
24 *al.*, 2010). The type 2 secretion system (T2S) secretine encoding gene *gspD*,

1 has been shown to be expressed during infection and to be antigenic  
2 (Rodriguez et al. 2007), the gene has been found in every serovar tested. The  
3 type 2 secretion system (T2S) locus has been found in the five genomes  
4 available at GenBank, Patoc, Copenhagueni, Hardjobovis L550, Hardjobovis  
5 BJ197 and Lai (Ren *et al.*, 2003, Nascimento *et al.*, 2004, Bulach *et al.*, 2006,  
6 Picardeu *et al.*, 2008) and has been also sequenced in the serovars Canicola  
7 an Icterohaemorrhagiae. The objective of this work was to compare the two  
8 available MLST schemes and to evaluate *gspD* as an alternative gene to  
9 improve a typing scheme for *Leptospira*. Analysis *in silico* of the *gspD* sequence  
10 showed the greatest variability in comparison with *lipL32*, *rrs* and *lipL41* genes.

11

## 12 **Material and Methods**

### 13 Culture and DNA extraction

14 Twelve reference strains representing 6 *Leptospira* species (*L. borgpetersenii*,  
15 *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilli*), were used in  
16 the study strains were donated by the WHO/FAO/OIE-Collaborative Centre of  
17 Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific  
18 Region, Brisbane, Australia (Table 3). Eighteen isolates obtained in Mexico  
19 from different animal species (dog, bovine, rat, pig and mouse), from different  
20 geographical areas were also included in the study (Figure 1 and Table 1).  
21 Strains were cultured in 100 ml of EMH medium at 30 °C for 7 days. Well  
22 developed cultures were concentrated by centrifugation at 10.000 x *g*/30 min and  
23 DNA was extracted from the pellet by the guanidine-thiocyanate and  
24 chloroform-isoamyl alcohol method as described previously (Boom R 1990).

1

2 *In silico* analysis

3 *gspD* sequences were obtained from chromosome I of *L. interrogans* serovars  
4 Fiocruz L1-130 (NC\_005823) and serovar Lai (NC\_004342); and from *L.*  
5 *borpetersenii* serovars Hardjobovis L550 (NC\_003508) and Hardjobovis BJ197  
6 (NC-008510) (Ren SX 2003; Nascimento AL 2004; Bulach DM 2006). Two  
7 primers were designed to amplify a conserved 568 bp DNA fragment of *gspD*  
8 (forward primer 3'-GAT TAT AGA ACG ATC ACT CAG- 5' and reverse primer  
9 3'-TTA TAT CTC CAA TCG ATC CC- 5'). All primers were synthesized at the  
10 Oligonucleotide Synthesis Facility, Institute of Biotechnology UNAM,  
11 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

12

13 MLST schemes

14 Characterization of isolates was performed using internal fragments of genes  
15 proposed in the schemes by Ahmed *et al.* (2006): *adk* (adenylate kinase), *icdA*  
16 (Isocitrate dehydrogenase), *lipL32* (Outer membrane lipoprotein LipL32), *lipL41*  
17 (Outer membrane lipoprotein LipL41), *rrs2* (16S rRNA) and *secY* (pre-protein  
18 translocase SecY) and the internal fragments of genes proposed by  
19 Thipandungpanit *et al.* (2007): *pntA* (NAD transhydrogenase subunit alpha-P),  
20 *sucA* (2-oxoglutarate dehydrogenase), *pfkB* (ribokinase), *tpiA* (triosefosfato  
21 isomerise), *mreA* (rod shape determines the protein rodA), *glmU* (UDP-N-  
22 acetylglucosamine pyrophosphorylase) and *fadD* (long chain fatty acids CoA  
23 ligase).

24



1 PCR, purification and sequencing of amplicons

2 The amplification of gene fragments was performed in a 50 µl reaction volume  
3 with 200 mM of dNTPs (Roche®), 5 µl 10x buffer, 10 pmol of primers and 30 a  
4 60 ng of genomic DNA as template, reactions were run in a Perkin Elmer 2400  
5 PCR System thermocycler. For the amplification of genes proposed by Ahmed  
6 *et al.*, 2006 the parameters used were: an initial denaturation step at 95 °C for 5  
7 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec, alignment at 54 °C  
8 for 45 sec and extension at 72 °C for 45 sec and one final extension at 72 °C for  
9 7 min. For the amplification of genes proposed by Thaipadungpanit *et al.* (2007)  
10 the annealing temperature used were from 50 °C to 54 °C. PCR products were  
11 separated by electrophoresis and visualized in ethidium bromide stained  
12 agarose gels. Amplicons were purified using Montage® columns, PCR products  
13 were sequenced at the Institute of Biotechnology, National Autonomous  
14 University of Mexico using an Applied Biosystems Model 3730 device with the  
15 Taq Dye Terminator Cycle method and by the Macrogen Inc., Seoul, Korea  
16 using an Automatic Sequencer 3730XL.

17

18 Sequence editing and analysis

19 Chromatogram quality, cut and editing from all sequences was assembled and  
20 edited using the Sequencher 4.6 program (Gene Codes Corporation). The  
21 sequences obtained from each gene fragment were compared with sequences  
22 of a database provided by professor Niyaz Ahmed, Hyderabad university, and  
23 the database available at <http://leptospira.mlst.net/>.

24

1 Polymorphic fragment used

2 The unreadable sequences at the ends of the DNA fragments were the primers  
3 were set, were taken out to leave only clear sequences. For that reason, in the  
4 Ahmed *et al.* scheme, three genes were reduced in the length of the  
5 polymorphic fragment proposed. For the *secY* proposed polymorphic fragment  
6 (549 bp), a 525 bp sequence was used; for *lipL41* a 500 bp sequence was used  
7 out of the proposed of 518 bp, and for *lipL32* a 450 bp sequence out of the  
8 proposed of 474 bp, was used. In contrast, for the Thaipadungpanit *et al.*  
9 scheme the complete length of the polymorphic sequence proposed was used  
10 in all the genes (Table 2).

11 For alleles comparison the Data Analysis for in the Molecular Biology and  
12 Evolution program (DAMBE) was used (Xia X 2001). The Sequence Type  
13 Analysis and Recombinational Tests Version 2 software (START2) (Jolley KA  
14 2004), was also used to calculate the pairwise ratios of nonsynonymous  
15 substitutions to synonymous substitution (the *dN/dS* ratio). The standard MLST  
16 statistics including the number of polymorphic sites, the average G-C content,  
17 and the allele frequencies, were calculate. The standardized index of  
18 association (*IAS*) was calculated as  $(1/l - 1)/l$ , where *l* is the number of loci  
19 (Jolley KA 2004). Phylogenic analysis was corroborated by analysis of the  
20 concatenated sequences with the program Molecular Evolutionary Genetics  
21 Analysis version 4.2 (MEGA 4.2) (Tamura K 2007).

22

## 23 **Results**

24 *gspD* is present in 6 pathogenic *Leptospira* species

1 Accordingly, using a global multiple alignment with *gspD* sequences from the  
2 GeneBank, we identified two conserved regions in the gene where primers were  
3 designed to amplify a 568 bp DNA fragment and a polymorphic fragment of 544  
4 bp. Such a DNA fragment was amplified from 12 *Leptospira* reference strains  
5 and 18 isolates from different animal species, and 4 sequences from GenBank  
6 were also included resulting in 13 different *gspD* genotypes (alleles). Three  
7 different *gspD* alleles were found in *L. borgpetersenii*: allele 1, in Mus 127,  
8 Castellon 3, Veldrat Bataviae 46 and the three mice isolates (CRAN13,  
9 CRAN14 and CRAN28) (18.18%); allele 2 was found only in serovar Hardjo,  
10 Hardjobovis L550 and allele 3 in Hardjobovis BJ197 (6.06%). Similarly *L.*  
11 *interrogans* showed also three alleles, the most frequent being allele 4 found in  
12 the serovar Canicola, reference strain Hound Utrecht IV, in the 7 dogs isolates  
13 (LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59, UADY22, CEL60), and  
14 in the pig isolate (Sinaloa ACR) (24.24%); allele 5 was found in serovar Hardjo,  
15 Hardjoprajitno and the bovine isolates (CAL6, and H89) (12.12%), and allele 6  
16 was found in the Icterohaemorrhagiae reference strain RGA, in isolates LOVe30  
17 (rat) and Palo Alto (dog) and in the GenBank sequences of Copenhageni  
18 FioCruz and Lai 56601 (12.12%). Allele 8 was found in *L. noguchii* reference  
19 strain Muenchen C90; allele 9 was found in the reference strain Moskva V and  
20 in the bovine isolate (CAL4) (6.06%); allele 10 was found in Cynopteri reference  
21 strain 3522 C; allele 11 was found in *L. noguchii* serovar Panama reference  
22 strain CZ 214K (3.03%); allele 12 in *L. santarosai* serovar Shermani reference  
23 strain 1342 K; and in two bovine isolates (MOCA45 and CAL7) (9.09%); finally,

1 allele 13 was found in *L. weillii* serovar Celledoni reference strain Celledoni  
2 (3.03%) (Table 3 and Figure 2).

3

#### 4 Amplification and sequencing of selected genes

5 With the Ahmed *et al.* (2006) scheme, the *rrs2* and *secY* genes fragments were  
6 amplified in all strains used yielding thirteen and eight alleles respectively. Even  
7 though genes *icdA* and *lipL41* showed also 13 alleles, *icdA* was not amplified in  
8 serovar Ballum reference strain Castellon-3 and *lipL41* was not amplified from  
9 serovar Celledoni reference strain Celledoni. Genes *adk* with 12 and *lipL32* with  
10 11 alleles were not amplified either from serovar Celledoni.

11 Using Thaipadungpanit *et al.* (2007) scheme, *glmU* gene showed 7 different  
12 alleles however, it was not amplified from the *L. weillii* and *L. santarosai* strains.

13 *pntA* showed 9 different alleles but was not amplified from the bovine isolates  
14 CAL7 and MOCA45 neither the serovar Shermani strain 1342 K. *sucA* specific  
15 primers amplified neither strains of *L. borgpetersenii* (Ballum Mus, Ballum  
16 Castellonis, Javanica), nor the three mice isolates, nevertheless 9 different  
17 alleles were obtained. The *fadD* gene fragment was amplified only from the *L.*  
18 *interrogans* strains, showing 6 alleles, but is not present in *L. borgpetersenii*  
19 genomes (Hardjobovis L550 and BJ197). The *pfkB* gene showed 9 alleles but it  
20 was not amplified from strains of *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* or *L. noguchii*.

21 The *tpiA* gene showed 8 different alleles but was not amplified from *L.*  
22 *borgpetersenii*, *L. santarosai* or *L. weillii*. The *mreA* gene showed 9 alleles,  
23 however the fragment was not amplified from *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* or  
24 *L. weillii* (Tables 2 and 3).

1 *gspD*, *icdA*, and *secY* were the genes with the largest number of alleles found  
2 with 13 and highest numbers of polymorphic sites: 264, 139 and 105  
3 respectively. Similarly, 13 different alleles were obtained in *lipL41* and 96  
4 polymorphic sites. *adk* and *lipL32* have 11 alleles each and 105 polymorphic  
5 sites. The *rrs2* gen showed the lowest number of alleles (8) and polymorphic  
6 sites (17). In contrast, using the Thaipadungpanit *et al.* scheme (2007) the  
7 largest number of polymorphic sites (44) was obtained in *fadD* with 6 different  
8 alleles. The *pntA* gene showed 9 different alleles and 43 polymorphic sites, *tpiA*  
9 and *pfkB* had 8 and 9 alleles respectively and 39 polymorphic sites each, *mreA*  
10 had 7 different alleles and 39 polymorphic sites, *sucA* showed 9 alleles and 31  
11 polymorphic sites; finally, the lowest number of polymorphic sites (27) was  
12 found in *glmU* with 7 different alleles, but again only the *L. interrogans* and *L.*  
13 *kirschneri* strains were amplified (Table 2).

14 The average number of alleles per locus for the six genes of Ahmed *et al.*  
15 (2006) was 11.33 (range, 8 to 13) and for Thaipadungpanit *et al.* (2007) was  
16 7.57 (range, 6 to 9). The average G-C content for each gene Ahmed *et al.* 2006  
17 was estimated in a range of 32.28% for *lipL32* up to 51.90% for the *rrs2* gene;  
18 and for Thaipadungpanit *et al.* (2007), the G-C content was estimated in  
19 35.80% for the *pfkB* up to 44.34% for the *pntA* (Table 2). No insertions or  
20 deletions were observed in any of the sequences. For every one of the 13  
21 genes, the concatenated sequences obtained from the 34 organisms compared,  
22 all them were aligned with no gaps and a number assigned. *gspD* showed 6  
23 deletions codifying for 2 amino acids in all *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* and  
24 *L. weillii* serovars. The sequences revealed from 17 (*rrs2*) up to 139 (*secY*)

1 polymorphic sites, in the Ahmed *et al.* scheme (2006) and from 27 (*glmU*) up to  
2 44 polymorphic sites (*fadD*) in the Thaipadungpanit *et al.* scheme (2007). The  
3 average *dN/dS* values shown in Table 2 were all <1, indicating that most of the  
4 sequence variability was selectively neutral for the genes included in the MLST  
5 analysis and the variation between alleles was always located at one or a few  
6 nonadjacent nucleotide sites. For each of the 14 genes, the number of  
7 synonymous substitutions was at least three times larger than the number of  
8 non synonymous substitutions that led to amino acid changes during translation  
9 (Table 2).

10

#### 11 Sequence types found

12 In the scheme of Ahmed *et al.* (2006), the sequence types (ST) obtained from  
13 the mice isolates (CRAN13, CRAN14 and CRAN28), were the same as that for  
14 *L. borgpetersenii* serovar Ballum Mus 127. The dog isolates obtained from  
15 Mexico City (LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46 and LOCaS59),  
16 Yucatan (UADY22), Sinaloa (Sinaloa ACR) and Toluca (CEL60) all them  
17 showed the same ST as the one from *L. interrogans* serovar Canicola strain  
18 Hond Utrecht IV. The bovine isolates CAL6 and H89 had the same ST as *L.*  
19 *interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno. The rat isolate (LOVe30)  
20 showed the same ST as *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain  
21 RGA. The bovine isolate (CAL4) shared the same alleles in the genes *adk*,  
22 *lipL41*, *rrs2* and *gspD*, with *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain Moskva  
23 V, while the three other genes in CAL4 (*lipL32*, *icdA* and *secY*), were conserved  
24 with those from other strains of *L. kirschneri*. Another bovine isolate (CAL7),

1 showed the same *rrs2* allele as that from other *L. santarosai* serovars (Table1).  
2 The lack of fragment amplifications resulted in the impossibility to characterize  
3 serovars Castellonis or Celledoni. For the Thaipadungpanit *et al.* (2007)  
4 scheme, it was not possible to obtain the STs of any isolate belonging to *L.*  
5 *borgpetersenii*, including the three isolates from mice (CRAN13, CRAN14 and  
6 CRAN28), the strains Ballum Mus 127, Ballum Castellonis Castellon 3 and  
7 Javanica Veldrat Bataviae 46. Similarly, it was not possible to amplify DNA  
8 fragments for every gene in *L. noguchii* serovar Panama; *L. santarosai* serovar  
9 Shermani, from any of the two bovine isolates (CAL7, MOCA45) and from *L.*  
10 *weillii* serovar Celledoni. STs were obtained for *L. interrogans* isolates obtained  
11 from dogs (LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59, UADY22,  
12 Sinaloa ACR and CEL60), all them showed the same ST as that *L. interrogans*  
13 serovar Canicola Hond Utrecht IV strain. The bovine isolates (CAL6 and H89)  
14 showed the same ST as *L. interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjoprajitno.  
15 The strain isolates LOVE30 and Palo Alto showed the same ST as the *L.*  
16 *interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae RGA strain. The bovine isolate CAL4,  
17 share the same alleles with *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain Moskva V  
18 with the exception of *tpiA* and *sucA* genes (Table 1).

19

## 20 **Discussion**

21 *gspD* encodes the putative secretine of the type two secretion system (T2S)  
22 found in *Leptospira*, it is conserved in the five genomes of pathogenic  
23 leptospires available up to date in GenBank, serovars Copenhageni  
24 (NC\_005823), Hardjobovis L550 (NC\_003508), Hardjobovis BJ197

1 (NC\_008510) and Lai (NC\_004342) it has also been sequenced in the non  
2 pathogenic serovar Patoc (NC\_010602) and has been sequenced in serovars  
3 Canicola (Ordóñez 2010) and Icterohaemorrhagiae (Flores 2006). In this study  
4 we discovered the presence of thirteen different *gspD* genotypes in a collection  
5 of twelve *Leptospira* reference strains, four GeneBank sequences and eighteen  
6 isolates from cattle, rat, pig, dogs and mice from different regions in Mexico.  
7 The specific *gspD* genotype distribution of the isolates examined was related to  
8 their STs determined by two different MLST schemes, in order to find a possible  
9 association between variations in the *gspD* gene and the genotypic framework  
10 provided by MLST. Its presence in all strains and the range in sequences  
11 variability (78 to 99%) made *gspD* as a suitable alternative to be used in an  
12 MLST scheme for *Leptospira* discrimination. The inclusion of *gspD* improves  
13 the robustness of MLST. Candidate genes to be used in an MLST scheme must  
14 be conserved in all strains for identification and have a high variability. *gspD*  
15 was amplified in all the strain studied, showed the highest number of  
16 polymorphic sites (264) and the number of alleles obtained with *gspD* was as  
17 high (13), as those obtained with *secY*, with the advantage of having the  
18 greatest discriminatory power of all considered genes. (Table 2)

19 The results obtained in the MLST analysis focus of this investigation supported  
20 earlier results regarding the weak clonal population structure of *Leptospira*  
21 (Letocart, Boerlin *et al.* 1999). Three new STs were found among the 34 strains  
22 studied providing further evidence of the great genotypic diversity of the  
23 *Leptospira* species and serovars (Figure 3). The partial sequences of six  
24 housekeeping genes of Ahmed *et al.* (2006), revealed a high level of genetic



1 variation; 501 nucleotidic substitutions were detected in a 2,964 bp  
2 concatenated sequence, yielding 17 sequence types (ST). In contrast, the  
3 partial sequences of seven housekeeping genes of Taipadungpanit *et al.*  
4 (2007), revealed 260 nucleotidic substitutions in a concatenated sequence of  
5 3,165 bp, yielding 8 ST. The estimates of the standardized index association  
6 values in this study (/A and /AS), indicated a significant linkage disequilibrium.  
7 These results further supported the conclusion that *Leptospira* has a weak  
8 clonal population structure (Letocart, Boerlin *et al.* 1999). Based on the  
9 amplification of the alleles or the genes proposed by the two schemes, it is  
10 possible conclude that the Ahmed *et al.* (2006) scheme, can be used to  
11 characterize isolates from the species *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L.*  
12 *interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* and *L. weillii*.  
13 Taipadungpanit *et al.* (2007) scheme on the other hand, can be used  
14 exclusively in the species *L. interrogans* and *L. kirschneri*. It is necessary to  
15 assess the patterns with serovars from other pathogenic species such as: *L.*  
16 *broomii*, *L. weillii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. alstonii*, *L. terpstrae* and *L.*  
17 *wolffii* to evaluate the use of these arrangements on species where no  
18 information of the characterization by MLST yet exists.

19 MLST analysis revealed the identity of *Leptospira* isolates from domestic  
20 animals and rodents, obtained in different years and from four diverse  
21 geographic locations in Mexico. The dog isolates from Mexico city (LOCaS28,  
22 LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46 and LOCaS59), from Yucatan (UADY22) and  
23 from Toluca (CEL60); one pig isolate from Sinaloa (Sinaloa ACR), as well as  
24 the reference strain Canicola Hond Utrecht IV, all these were assigned the

1 ST251. Isolates CAL6 and H89 obtained from cattle have the same ST that *L.*  
2 *interrogans* serovar Hardjo (ST254). The rat isolate (LOVe30) and the dog  
3 isolate (Palo alto), both were assigned the ST5, the same as *L. interrogans*  
4 serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA. In addition, we report here, three new  
5 STs: ST259 a bovine isolate (CAL4), shares the same alleles with *L. kirschneri*  
6 serovar Grippotyphosa in genes *adk*, *lipL41*, *rrs2* and *gspD*, while the other  
7 three genes (*lipL32*, *icdA* and *secY*), were observed in *L. kirschneri* strains  
8 other than Grippotyphosa. The STs, ST260 and ST261 were also obtained  
9 from cattle and share the same *rrs2* allele with various serovars of *L.*  
10 *santarosai*, however the other genes showed new alleles that phylogenetic  
11 analysis suggested they belong to *L. santarosai*. The sequence type ST250 of  
12 *L. borgpetersenii* serovar Ballum has not been reported previously in either  
13 MLST schemes, here we report for the first time the same ST for this serovar  
14 and the three mice isolates (Figure 1). Thaipadungpanit *et al.* scheme (2007)  
15 was of not use to characterize any of such isolates, because of failure in PCR  
16 amplification. None of the seven genes proposed in this scheme amplified all  
17 the strains (Table 3). The isolates CAL4, CAL7, MOCA45 and the three mice  
18 isolates (CRAN13, 14 and 28) have not been previously reported in Mexico,  
19 furthermore, in the case of ST257, the bovine isolate CAL7 of *L. Santarosai*, it  
20 has not been previously reported worldwide.

21 The discrimination of isolates in a region would allow to establish specific  
22 programs for prevention and control of leptospirosis. Here, we present the first  
23 census of serovars and species found in Mexico up to date characterized by  
24 MLST. This confirmed the presence of serovars adapted to a maintenance

1 host, such as the case of serovar Ballum adapted to different mice species;  
2 Canicola to dogs; Hardjoprajitno to cattle and Icterohaemorrhagiae to rat. This  
3 is a call for disease control and public health, our findings point out the infection  
4 risk that exists for some population groups. MLST has been used to  
5 characterize new isolates from a variety of pathogenic and non-pathogenic  
6 microorganism ([www.mlst.net/](http://www.mlst.net/), [pubmlst.org/](http://pubmlst.org/), [mlst.ucc.ie](http://mlst.ucc.ie)). The two MLST  
7 schemes used in this study for characterization of isolates of *Leptospira*, allow  
8 us to know whether strains are pathogenic or saprophytes, the species,  
9 serogroup and serovar of the isolates. MLST is a fast and promising technique  
10 highly robust, portable and unambiguous for the accurate characterization of  
11 *Leptospira* isolates.

12

13

1 **Acknowledgements**

2 The authors are grateful to all institutes, universities and searchers for the facilities to  
3 donated the isolates. This project was sponsored by the UNAM/PAPIIT IN222806 an  
4 IN221409, CONACyT scholarship No 165530 of the first author, SEP-CONACyT 83123  
5 and MACROPROYECTO UNAM.

6

7

## 1   **References**

- 2       • Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Steigerwalt, A.G., 2006.  
3       *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis,  
4       International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56,  
5       671–673.
- 6       • Zakeri S., Khorami N., Ganji Z.F., Sepahian N., Malmasi A., Mehdi G. M.,  
7       Djadid N.D., *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira*  
8       species detected in human, sheep and dog, Infection, Genetics and  
9       Evolution, article in press. 2010.
- 10      • Faine S, *Leptospira and Leptospirosis*, CRC. Press Inc, 1999
- 11      • Levett, P.N., 2001, *Leptospirosis*, Clinical Microbiology Review, 14, 296–  
12      326.
- 13      • WHO, 2000 WHO, 2000
- 14      • Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M. 2009, *Leptospira*: the dawn of the  
15      molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature 9:  
16      736-747.
- 17      • Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010, *Leptospira* and  
18      Leptospirosis, Veterinary Microbiology, 140:287–296
- 19      • WHO, 2003, Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance  
20      and control, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data,  
21      <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
- 22      • Brown PD, Levett PN: Differentiation of *Leptospira* species and serovars  
23      by PCR-restriction Endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and  
24      low-stringency PCR. *J Med Microbiol* 1997, 46:173-181.

- 1 • Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Girons IS: Pulsedfield  
2 gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid  
3 method of serovars identification. *J Clin Microbiol* 1992, 30:1696-1702.
- 4 • Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G: Characterization of *Leptospira*  
5 isolates from serovars hardjo by Ribotyping, arbitrarily primed PCR, and  
6 mapped restriction site polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1994, 32:1949-  
7 1957.
- 8 • Vijayachari P, Ahmed N, Sugunan AP, Ghousunnisa S, Rao KR, Hasnain  
9 SE, Sehgal SC: Use of Fluorescent Amplified Fragment Length  
10 Polymorphism for Molecular Epidemiology of Leptospirosis In India. *J*  
11 *Clin Microbiol* 2004, 42:3575-3580.
- 12 • Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M:  
13 Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira*  
14 *interrogans sensu stricto*. *J Clin Microbiol* 2005, 43:539-545.
- 15 • Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde, M.de L., Vijayachari P., Machangu,  
16 R.S., Ellis W.A., Hartskeerl, R.A., 2006, Multilocus sequence typing  
17 method for identification and genotypic classification of pathogenic  
18 *Leptospira* species, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,  
19 23;5:28.
- 20 • Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD,  
21 Petkanchanapong W, Limpaboon R, Apiwatanaporn A, Slack AT,  
22 Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. A dominant  
23 clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human  
24 leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007 Oct 31;1(1):e56.

- 1 • Cerqueira, G.M., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A., Ahmed, N.,  
2 Dellagostin, O.A., Eslabão, M.R., Nascimento. A.L.T.O. Bioinformatics  
3 describes novel loci for high resolution discrimination of *Leptospira*  
4 isolates. Plos ONE, 5; e15335
- 5 • Rodríguez REA Alcaraz SLE Cullen PA Bulach DM Adler B Haake DA  
6 De la Peña-Moctezuma A, GspDL the Type II Secretion System (T2SS)  
7 secretin of *Leptospira* is expressed during Infection, abstraes of 5th  
8 Meeting of the international Leptospirosis Society, Quito Ecuador, 2007
- 9 • Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H,  
10 Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z,  
11 Sheng HH, Yin HF, Zhang , Zhu F, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang  
12 SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A,  
13 Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao  
14 GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira*  
15 interrogans revealed by hole-genome sequencing. Nature. 2003 Apr  
16 24;422(6934):888-93.
- 17 • Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake  
18 DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC,  
19 Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraive WM, Dellagostin  
20 OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA,  
21 Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM,  
22 Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos  
23 MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS,  
24 Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA,

- 1 Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA: Comparative  
2 genomics of two *Leptospira interrogans* pathogenesis. *J Bacteriol* 2004,  
3 186:2164-2172.
- 4 • Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA,  
5 Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL,  
6 Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira*  
7 *borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci*  
8 *U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14560-5
  - 9 • Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson  
10 PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A,  
11 Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood  
12 JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C, Adler B. Genome sequence of the  
13 saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of  
14 *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One.* 2008 Feb  
15 13;3(2):e1607.
  - 16 • Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C. L., Wertheim van  
17 Dillen, P.M.E., Van der Noordaa, J., 1990, Rapid and Simple Method for  
18 Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 495-503.
  - 19 • Xia, X., and Xie. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology  
20 and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.
  - 21 • Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC: Sequence type analysis and  
22 recombinational tests (START). *Bioinformatics* 2001, 17:1230-1231.



- 1 • Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular
- 2 Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular
- 3 Biology and Evolution, 24, 1596–1599.
- 4

## 1 Tables and Figures

	Specie	Serogroup	Serovar	Isolate	Characterization method	Year	Institution
1	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 13	Serology, IS1533,16S,RLFP	2006	FMVZ- UNAM
2	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 14	Serology, IS1533,16S,RLFP	2006	FMVZ- UNAM
3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 28	Serology, IS1533,16S,RLFP	2006	FMVZ- UNAM
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	CEL60	Serology,16S,RLFP	2002	FMVZ- UAEMex
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 28	Serology	2004	FMVZ- UNAM
6	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 31	Serology	2004	FMVZ- UNAM
7	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 34	Serology	2004	FMVZ- UNAM
8	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 46	Serology	2004	FMVZ -UNAM
9	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 59	Serology	2004	FMVZ -UNAM
10	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	UADY22	Serology	2002	FM- UADY
11	<i>L. kirshneri</i>	Grippotyphosa	-----	CAL4	Serology,16S	2003	FMVZ- UAEMex
12	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	CAL6	Serology,16S	2003	FMVZ -UAEMex
13	<i>L. santarosai</i>	Mini	-----	CAL7	Serology,16S	2003	FMVZ- UAEMex
14	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	LOVe30	-----	2008	FMVZ -UNAM
15	<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	-----	MOCA45	Serology	2010	FMVZ- UNAM
16	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	H89	Serology	1989	FMVZ- UAM
17	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Portland vere	Sinaloa ACR	Serology	1992	FMVZ- UAM
18	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Palo Alto	Serology	-----	CENID-INIFAP

2

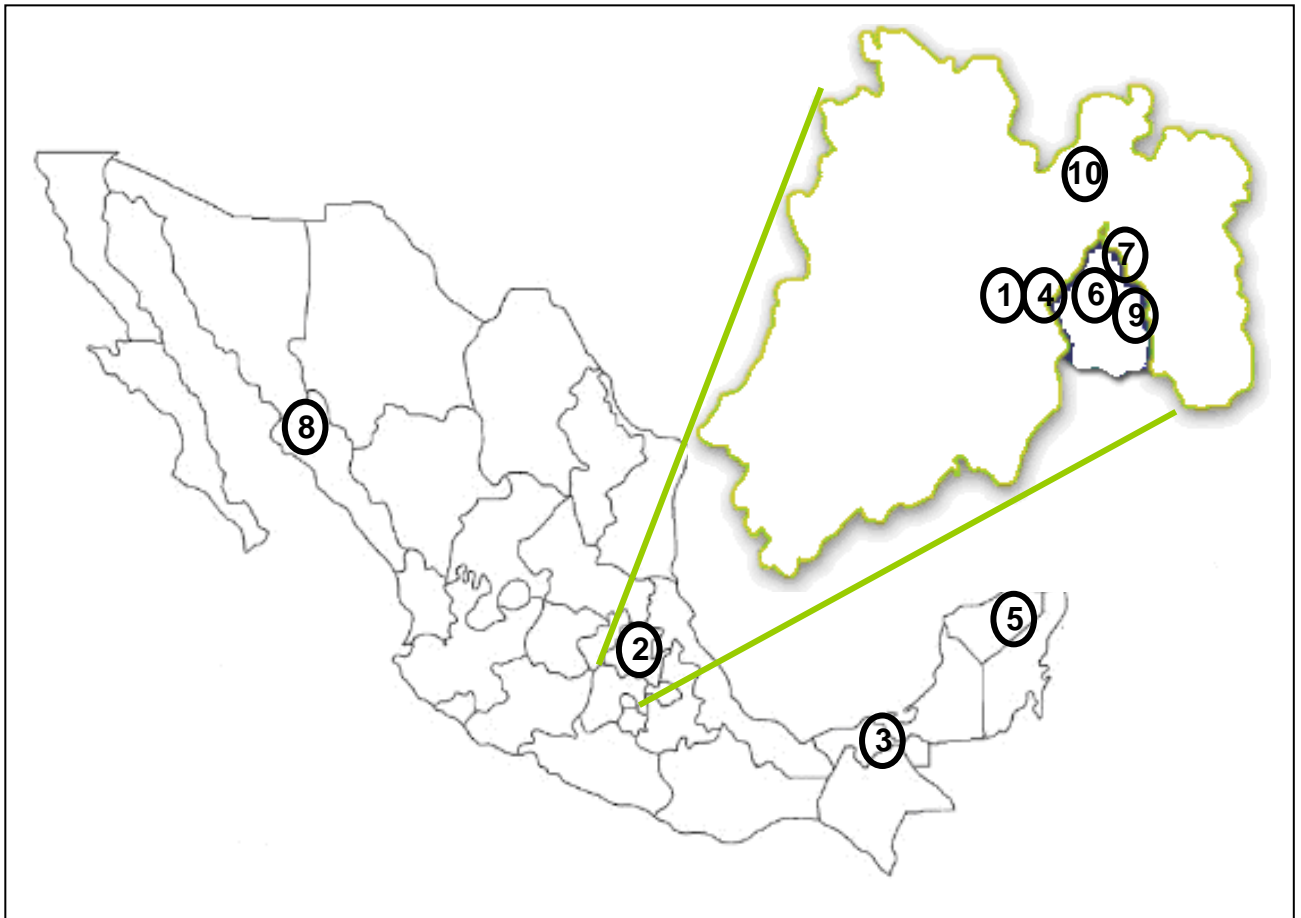
Table 1. Cense about the Mexican isolates. Were proportioned for different laboratories of deferent places of México, FMVZ UNAM: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; FMVZ UAEMex: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México; FMVZ UAM-X Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco; FM UADY Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán; CENID-INIFAP: Centro Nacional de Investigación disciplinaria en Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Gene	Ahmed <i>et al.</i> , 2006							Thaipadungpanit <i>et al.</i> , 2007						
	<i>gspD</i>	<i>adk</i>	<i>icdA</i>	<i>secY</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>glmU</i>	<i>pntA</i>	<i>sucA</i>	<i>fadD</i>	<i>tpiA</i>	<i>pfkB</i>	<i>mreA</i>
Length (bp)	1798	564	1197	1383	819	1068	1512	759	1169	2762	1938	752	986	1523
Amplified fragment (bp)	550	531	674	549	474	520	541	450	637	539	576	533	538	601
Polymorphic sequence (bp)	528	430	557	520	450	500	452	444	525	447	456	426	432	435
Polymorphic sites	264	105	105	139	39	96	17	27	43	31	44	39	39	37
No. of alleles found	13	12	13	13	11	13	8	7	9	9	6	8	9	7
Strains amplified	30	29	29	30	29	29	30	26	27	24	19	20	20	20
% GC	41.3	41.6	40.6	38.2	46.56	42.46	51.9	39.5	44.3	42.6	35.9	39.2	35.8	38.0
dN / dS	0.11	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	2.07	0.04	0.00	0.00	0.04	0.06	0.02	0.01

6

Table 2. Allelic diversity parameters used to compare *gspD* versus the genes included in Ahmed *et al.*, 2006 and Thaipadungpanit *et al.*, 2007 schemes in this study (the results were estimated only with the strains that had sequence type)

1



2

	Source	Strain	Place	Geolocation
1	Bovine	CAL 4, CAL6, CAL7	Toluca, Estate of Mexico	19° 19' 1.69'' N 99° 37' 52.65'' W
2	Bovine	H89	Tizayuca, Hidalgo	19° 49' 60'' N 98° 58' 60'' W
3	Bovine	MOCA45	Villa Hermosa, Tabasco	18° 1' 8.65'' N 92° 55' 22.26'' W
4	Dog	CEL60	Toluca, Estate of Mexico	19° 24' 28.54'' N 99° 41' 23.87'' W
5	Dog	UADY22	Merida, Yucatan	20° 58' 12.18'' N 89° 37' 12.01'' W
6	Dog	Palo Alto	Cuajimalpa, Federal District	19° 22' 47.65'' N 99° 15' 22.19'' W
7	Dog	LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59	San Juan de Argón, Federal District	19° 27' 51.57'' N 99° 4' 40.72'' W
8	Swine	Sinaloa ACR	Sinaloa	24° 47' 12.25'' N 117° 22' 49.34'' W
9	Rat	LOVe30	Taxqueña, Federal District	19° 20' 15.61'' N 99° 7' 29.55'' W
10	Mause	CRAN13, CRAN14, CRAN28	Teoloyucan, Estate of Mexico	19° 44' 11'' N 99° 9' 1'' W

3

4 Figure 1. Origin of the isolates used in this study. Displays the name of the isolate, animal host which it was isolated and Geographic place where isolate was obtained.

5

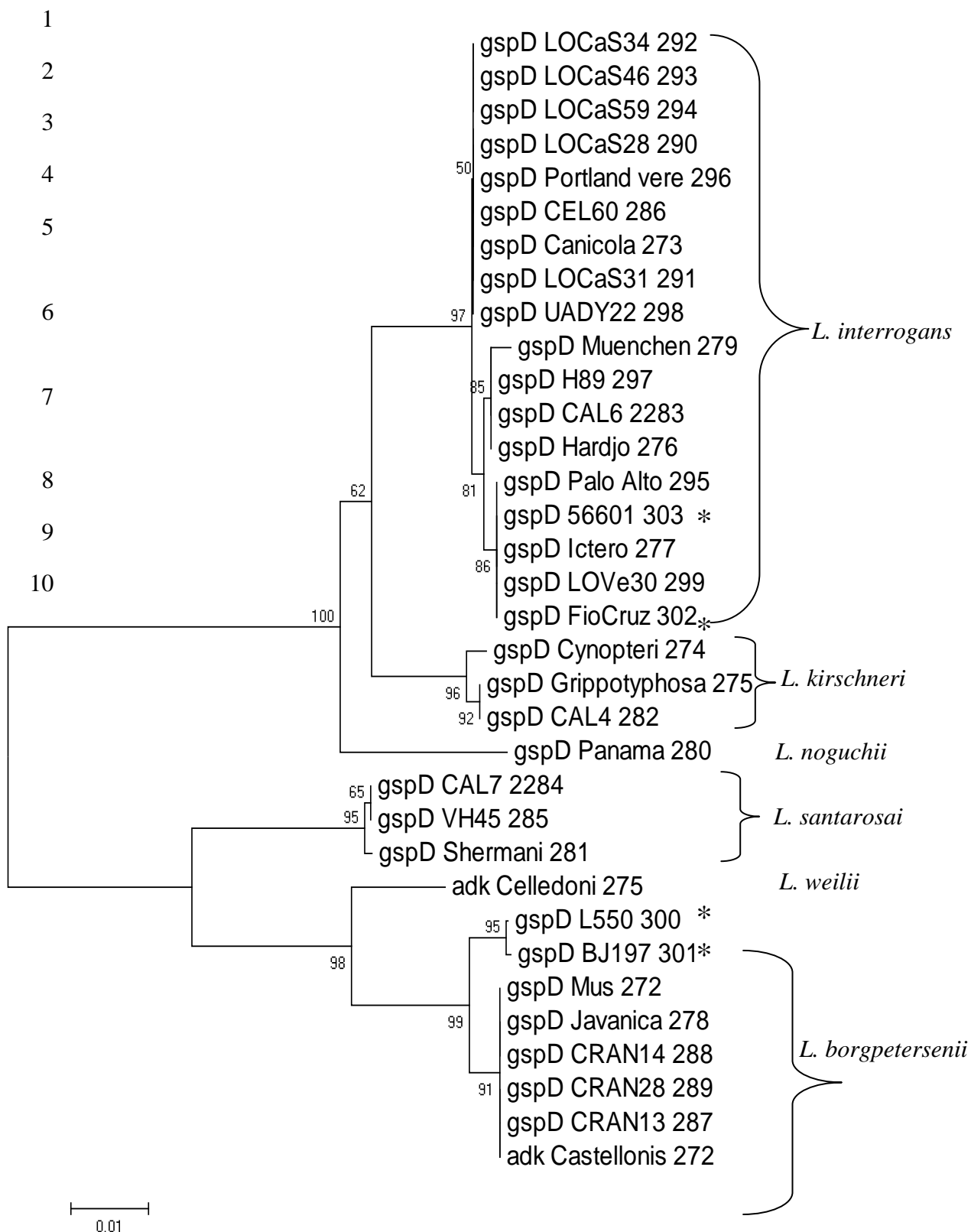


Figure 2. Distance matrix of selected *gspD* sequences from Mexican isolates, reference strains and Genbank sequences obtained by Neighbor Joining 2000 replicates. The percentage of replicates is identified as a number nearest to branch, after multiple alignment with the BioEdit program, of different *gspD* alleles of *Leptospira*. Alleles with more less than 0.02 were classified by specie. The *gspD* nucleotide sequences from gene bank are marked with an asterisk.

1  
2

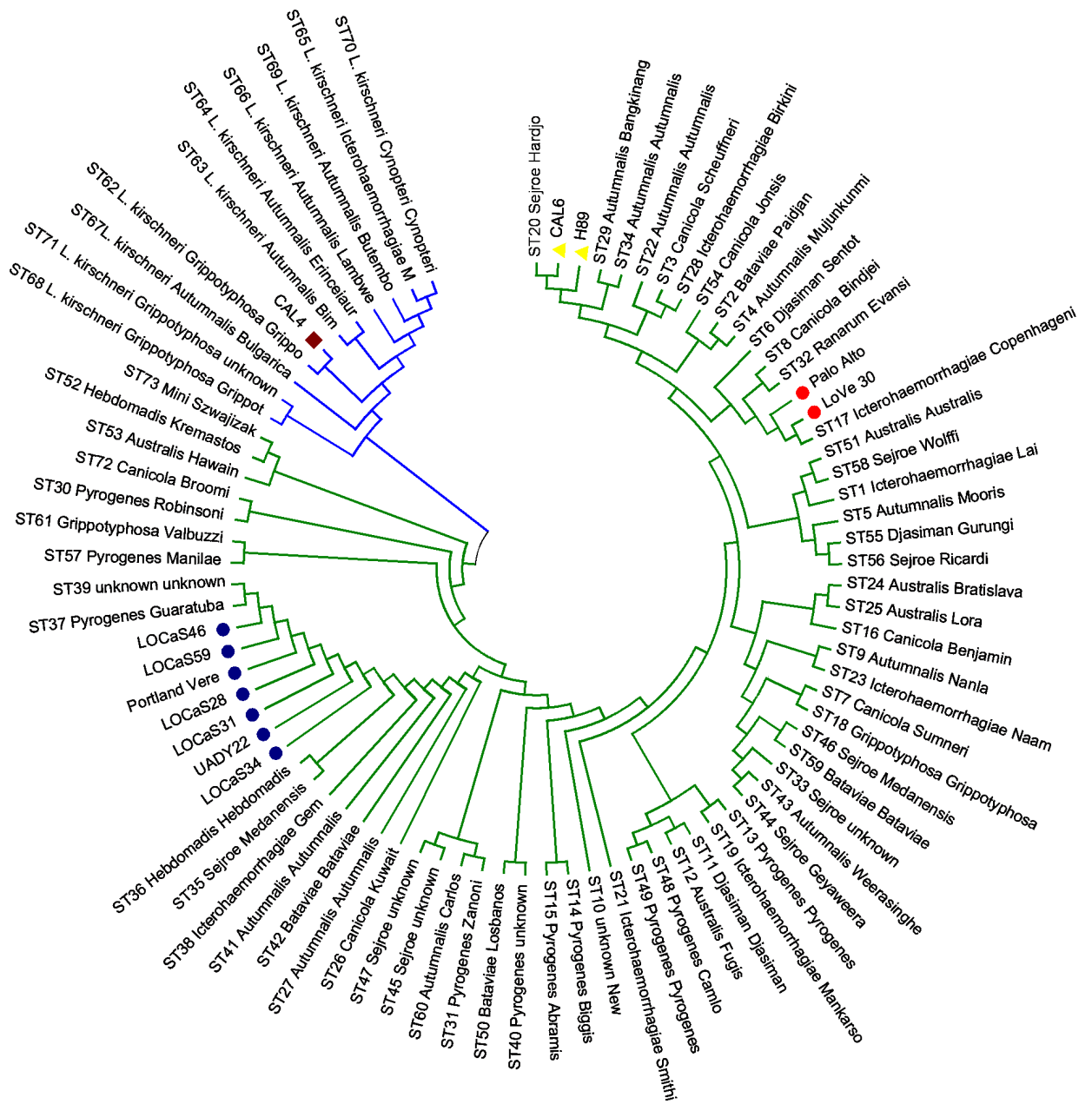
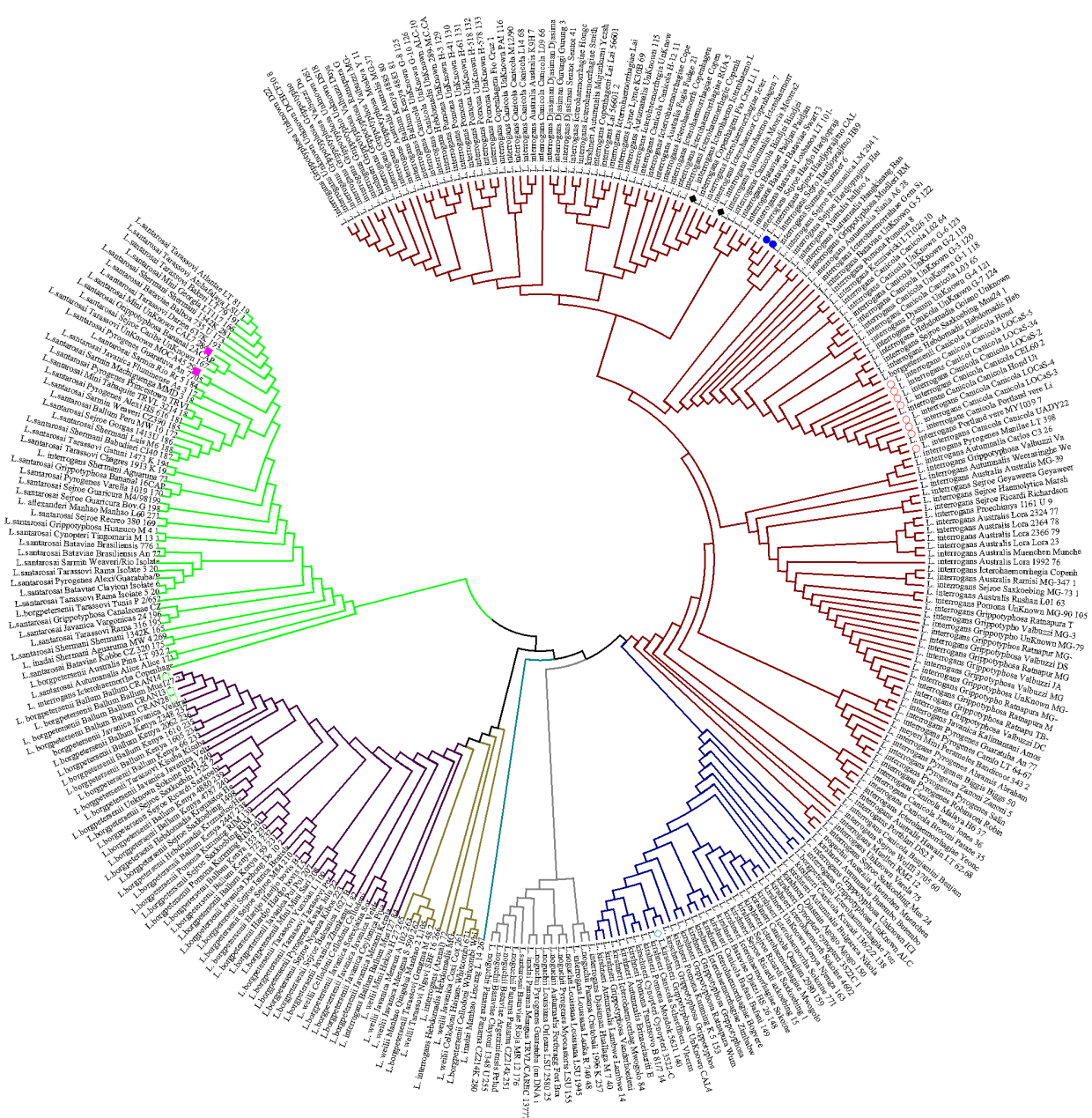


Figure 2. Genetic relatedness among Mexican isolates. Based on databases the concatenated sequences of the seven candidate housekeeping genes loci proposed by Thaipadungpanit *et al.* (2007). See table 1 for detailed information on isolates/strains.

1  
4  
5  
6  
7

Figure 3. Genetic relatedness among Mexican isolates. Based on databases the concatenated sequences of the six candidate housekeeping genes loci analyzed proposed by Ahmed *et al.* 2006. See table 1 for detailed information on isolates/strains.



Specie	Serogroup	Serovar	strain	Ahmed et al., 2006 scheme								Thaipadungpanit et al., 2007 scheme							
				<i>gspD</i>	<i>adk</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>secY</i>	ST	<i>glmU</i>	<i>pntA</i>	<i>sucA</i>	<i>fadD</i>	<i>tpiA</i>	<i>pfkB</i>	<i>mreA</i>	ST
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3	1	115	0	51	55	41	34		1	1	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	127	1	115	97	51	55	41	34	250	1	1	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 13	1	115	97	51	55	41	34	250	1	1	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 14	1	115	97	51	55	41	34	250	1	1	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus	CRAN 28	1	115	97	51	55	41	34	250	1	1	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia	1	98	76	74	55	41	34	255	1	7	0	0	0	0	0	
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	L550	12	87	79	75	123	41	118	262	6	9	8	n/found	7	8	6	
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	hardjobovis	BJ197	13	87	121	75	124	41	118	263	6	9	8	n/found	7	8	6	
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	CEL60	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 28	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 31	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 34	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 46	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	LOCAS 59	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	UADY22	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Portland vere	Sinaloa	2	2	1	1	1	2	7	251	3	3	3	2	3	4	5	37
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjo prajitno	5	5	2	2	3	2	113	254	1	1	2	6	1	7	4	20
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	CAL6	5	5	2	2	3	2	113	254	1	1	2	6	1	7	4	20
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	H89	5	5	2	2	3	2	113	254	1	1	2	6	1	7	4	20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrh	Icterohaemorrh	RGA	6	1	1	2	2	1	1	5	1	1	2	1	2	10	4	17
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrh	Icterohaemorrh	MR30	6	1	1	2	2	1	1	5	1	1	2	1	2	10	4	17
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrh	Icterohaemorrh	Palo Alto	6	1	1	2	2	1	1	5	1	1	2	1	2	10	4	17
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrh	Copenhageni	FioCruz	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	10	4	17
<i>L. interrogans</i>	Lai	Lai	56601	6	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>L. kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522-C	8	39	32	13	42	24	112	252	17	22	15	19	22	33	18	70
<i>L. kirshneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	4	28	119	18	120	66	9	253	12	19	11	17	21	30	17	62
<i>L. kirshneri</i>	Grippotyphosa	-----	CAL4	4	28	120	63	122	66	43	259	12	19	22	17	22	30	24	114
<i>L. noguchii</i>	Australis	München	München C90	9	5	2	51	120	41	34	256	9	1	2	1	4	13	9	58
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	(CZ214K)	7	17	101	8	105	67	114	257	7	8	5	0	8	0	8	
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342-K	10	52	52	22	121	18	115	258	0	0	6	0	0	0	0	
<i>L. santarosai</i>	Mini	-----	CAL7	11	117	45	34	79	18	116	260	0	0	6	0	0	0	0	
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	-----	MOCA45	11	50	45	22	74	18	117	261	0	0		0	0	0	0	
<i>L. weilii</i>	Celedoni	Celedoni	Celedoni	3	0	118	0	0	65	105		0	3	9	0	0	2	0	

Table 3. Number of alleles and STs number found to amplified fragments of genes from the reference strains, *Leptospira* isolates and genes found in the genomes published in GeneBank. The boxes in red indicate that the primers did not amplify the fragment, in black boxes indicate the STs not assigned to the stains or isolates due to lack of amplified fragments.

## CAPÍTULO 7. Discusión

El gen *gspD* codifica para la supuesta secretina del sistema de secreción tipo II (T2S) de *Leptospira*, éste fue encontrado en los cuatro genomas que actualmente se encuentran disponibles en GenBank de las serovariedades Copenhageni (NC\_005823), Hardjobovis L550 (NC\_003508), Hardjobovis BJ197 (NC\_008510) and Lai (NC\_004342), *gspD* también ha sido secuenciado en la serovariedad Patoc (NC\_010602) de *L. biflexa* y en las serovariedades Canicola <sup>[125]</sup> e Icterohaemorrhagiae <sup>[124]</sup>. Se encontraron 13 alelos de *gspD* en una colección de 12 cepas de referencia, 4 secuencias encontradas en el GeneBank y 18 aislados de bovinos, rata, cerdo, perros y ratones obtenidos en diferentes tiempos y regiones de México. La distribución de los genotipos de *gspD* de los aislados examinados está relacionada con los STs determinados por los dos esquemas de MLST y existe asociación entre las variaciones en el gen *gspD* y el marco genotípico proporcionado por MLST.

La inclusión de *gspD* mejora la robustez del MLST. *gspD* está presente en todas las cepas y aislados utilizados con una variabilidad del 78 al 99%. Los genes candidatos para ser usados en MLST tienen que ser altamente conservados en todas las cepas y deben tener una alta variabilidad <sup>[201, 206]</sup>. *gspD* fue amplificado de todas las cepas estudiadas y mostró junto con *secY* el número más alto de alelos (13) y tuvo el número más alto de sitios polimórficos (264), esto se traduce en el mejor poder discriminatorio sobre todos los genes considerados.

Los resultados obtenidos en el análisis de los genes concuerdan con la hipótesis de que *Leptospira* tiene una débil estructura poblacional clonal <sup>[202]</sup>. Tres nuevos STs se encontraron entre las 34 cepas estudiadas proporcionando una prueba más de la gran diversidad genética de las especies y serovariedades de *Leptospira*. Las secuencias parciales de seis genes propuestos por Ahmed *et al.* (2006) <sup>[217]</sup>, revelaron un alto nivel de variación genética; 501 sustituciones



nucleotídicas fueron detectadas en una secuencia concatenada de 2,964 pb, produciendo 17 STs. Por el contrario, las secuencias parciales de siete genes de propuestos por Thaipadungpanit *et al.* (2007) <sup>[218]</sup>, revelaron únicamente 260 sustituciones nucleotídicas en una secuencia concatenada de 3,165 pb y sólo 8 STs.

Con base en la amplificación de los alelos o genes propuestos en los dos esquemas, es posible concluir que el esquema de Ahmed *et al.* (2006) <sup>[217]</sup>, puede ser utilizado para caracterizar los aislados de las especies *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weillii*. Por otro lado, el esquema de Thaipadungpanit *et al.* (2007) <sup>[218]</sup>, puede ser utilizado exclusivamente en aislados de las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri*. Es necesario evaluar los patrones de serovariedades de otras especies patógenas, tales como: *L. broomii*, *L. weillii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. alstonii*, *L. terpstrae* y *L. wolffii* para determinar los STs de las especies en donde todavía no existe información sobre su caracterización por MLST.

El análisis MLST reveló la identidad de los aislados de *Leptospira* obtenidos de diferentes animales domésticos y roedores y de diversas zonas geográficas en México. Los aislados de perros de la ciudad de México (LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46 y LOCaS59), de Yucatán (UADY22) y de Toluca (CEL60) y un aislado de cerdo de Sinaloa (Sinaloa ACR), así como la cepa de referencia Canicola Hond Utrecht IV, todos estos se les asignó el ST251. Los aislados de bovino obtenidos en Toluca CAL6 y en Tizayuca (H89) obtenidos de animales tienen el mismo ST (ST254) que *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajtino). A los aislados de rata (LOVe30) y de perro (Palo Alto) se les asignó el ST5, al igual que a *L. interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.

El ST250 de *L. borgpetersenii* serovariedad Ballum no ha sido reportado por ninguno de los esquemas de MLST por lo que aquí se reporta por primera vez este ST aislado a partir de ratones.

Además, se obtuvieron tres nuevos STs: La tipificación por MLST de CAL4 mostró un nuevo tipo de secuencia: ST259, no registrado anteriormente en ninguna otra serovariedad de *Leptospira* y que filogenéticamente evolucionó a partir de la serovariedad Grippotyphosa cepa Moskva V. CAL4, mostró los mismos alelos en los genes, *adk*, *lipL41*, *rrs2* y *gspD*, con *L. kirschneri* serovariedad Grippotyphosa mientras que los otros tres genes (*lipL32*, *icdA* y *secY*), se observaron en otras cepas de *L. kirschneri* distintas Grippotyphosa. Lo anterior concuerda con la identificación serológica, donde se obtuvo el mayor título de anticuerpos con la serovariedad Grippotyphosa.

En diferentes países se ha registrado la infección en bovinos con serovarietades atípicas (diferentes a Hardjo), que se presentan en forma endémica en una región, pero no se conoce el impacto que dichas serovarietades puedan tener sobre la producción y sobre la salud de los animales y del hombre, así como la probable fuente de infección, tal es el caso de las serovarietades Kennewicki en Chile <sup>[220]</sup>, Zaroni en Australia <sup>[221]</sup>, Fugis y Zimbabwe en Zimbabwe <sup>[222]</sup>, y Guaricura en Brasil <sup>[223]</sup>. En el presente trabajo se informa sobre el aislamiento de serovarietades que no son registradas comúnmente en bovinos, como son los casos de los aislados CAL7 de la serovariedad Mini (ST260) y MOCA45 de la serovariedad Tarassovi (ST261), ambos aislados de la especie *L. santarosai*. La serovariedad Mini ha sido registrada en las especies *L. interrogans* <sup>[224]</sup> y *L. borgpetersenii* <sup>[225]</sup>, pero Mini de *L. santarosai* no se había encontrado en bovinos, por otro lado, la serovariedad Tarassovi de la misma especie, *L. santarosai*, ha sido aislada previamente de bovinos en Centro y Sudamérica, pero no en México, hasta este informe.

Es generalmente conocido que la sensibilidad de la prueba de AM aumenta cuando se incluyen las cepas aisladas (autóctonas) de la región geográfica <sup>[69, 226, 227]</sup>. Por lo que se sugiere sustituir los aislados por las cepas de referencia para futuros estudios serológicos, además de realizar la búsqueda de éstas y otras serovarietades que prevalecen en la región, mediante el aislamiento del agente etiológico, y no sólo con base en los resultados de serología.

La identificación de las cepas de leptospiras en una región, da pautas para establecer programas de prevención y control de la leptospirosis. Aquí se presenta el primer censo de las serovariedades y especies que han sido aisladas y caracterizadas por MLST. Esto confirma la presencia de serovariedades adaptadas a hospederos de mantenimiento, como es el caso de la serovariedad Ballum (ST250) adaptada a ratones; Canicola (ST251) adaptada a los perros; Hardjoprajitno (ST254) adaptada a los bovinos e Icterohaemorrhagiae (ST5) adaptada a las ratas. Estos hallazgos son una llamada de atención para las autoridades de salud pública sobre los puntos de riesgo de infección existentes para algunos grupos de poblaciones.

El MLST ha sido usado para caracterizar nuevos aislados tanto de microorganismos patógenos y no patógenos <sup>[201, 207, 215]</sup> ([www.mlst.net/](http://www.mlst.net/), [pubmlst.org/](http://pubmlst.org/), [mlst.ucc.ie](http://mlst.ucc.ie)). Los dos esquemas de MLST utilizados en este estudio para caracterizar aislados de *Leptospira*, permitió caracterizar las cepas y conocer si las cepas son saprófitas o patógenas, el serogrupo y la serovariedad de cada aislado. MLST es una rápida y prometedora técnica con alta robustez, portátil y no ambigua para la caracterización correcta de aislados de *Leptospira*.

## CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of *Leptospirosis*. PLoS ONE 2008;3:1607e
2. Waitkins S. Hookey JV. Leptospirosis as an occupational disease. Br J Ind Med 1986;20:721-725.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis* 2da ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.
4. OMS. Leptospirosis worldwide. Weekly Epidemiological Record 1999; 74: 237-242.
5. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Maxel M, Matsunaga J, Galvao RM. Leptospiral proteins recongnized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun 2001;69:4958-4968.
6. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003; World Health Organizati3n.
7. Leal CC, Garc3a SR, Gonz3lez FE, Fuentes AJ, *et al.* Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, M3xico. Epidemiol Infect 2003: 131:1149-1156.
8. Rodriguez I, Fernandez C, Llerena C, Victoria B, Rodriguez J, Obreg3n A. *Lepto dipstick*: resultados de su aplicaci3n al diagn3stico r3pido de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop 2002;54:44-47.
9. Carneiro M, Giacomini ML, Costa JM. Leptospirosis asociada a la exposici3n ocupacional: Estudio cl3nico y epidemiol3gico. Rev Chil Infect 2004;21:339-344.
10. C3spedes ZM, Ormaeche MM, Condori P, Balda JL, Glenny MA. Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Per3. Rev Peru Med Exp salud publica 2003;20:180-185.

11. Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Peru Med Exp salud publica* 2005;22: 290-307.
12. Tangkanakul W, Tharmapornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasein P. *et al.* Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand. 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63:204-208.
13. Meites E, Michele T, Deresinski S, Shieh WJ, Zari SR, Tompkins L. Reemerging leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis* 2004;10:406-412.
14. Bharadwaj R. Leptospirosis a reemerging disease?. *Indian J Med Res* 2004;136-138.
15. André-Fontaine G. Canine leptospirosis. Do we have a problem?. *Vet Microbiol* 2006;117:19-24.
16. Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney BG. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. *Australian Vet J* 1994;71: 290-294.
17. Rossetti CA, Vanasco BN, Pini N, Carfagnini JC. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesq Vet Bras* 2004; 24:6-10.
18. Gibson da Silva F, Cesar d Freitas J, Kuroki AE, Yumi HV, *et al.* Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Paraná state, Brazil. *Braz J Microbiol* 2005;36:38-42.
19. Delgado F, Brihuega B, Venzano A, Funes D, Blanco VF. Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira spp.*, en muestras de tejido fijado en formaldehído. *Rev Cubana Med Trop* 2007;59.
20. Adler B, de la Peña-Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140: 287-296.
21. Tangkanakul W, Tharmapornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasein P. *et al.* Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand. 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63:204-208.

22. Ochoa JE, Sánchez A, Ruiz I, Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuária. Rev Panam Salud Pública 2000;7:325-330.
23. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. International Microbiology 2004;7:35-40.
24. Mejia ME, Barragan V, Zapata S, Trueba G. 5th Meeting of the international Leptospirosis Society. in Interactions of pathogenic *Leptospira* with enviromental bacterial. 2007 Quito, Ecuador.
25. Carrada T. Leptospirosis humana, Historia natural, diagnóstico y tratamiento. Rev Mex Patol Clin 2005;52:246-256.
26. Radostits OM, Gay C. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Medicina Veterinaria. 8va ed. McGraw-Hill Interamericana 1999.
27. Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli C, *Leptospira interrogans* in a canine population of Greater Buenos Aires: variables associated with seropositivity. Rev Pan Salud Publica 1997;2:102-105.
28. Lemarroy VD, Carrillo VM. Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple. Caso clínico y revisión de la literatura. Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva 2003;17:176-183.
29. Rao A. Preventive measures for leptospirosis: Rodent control. Ind J Med Microbiolo 2006;24:325-328.
30. Quinn PJ, Carter M, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2002: 684 Elsevier Health Sciences.
31. Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. Public Health Reports (Washington) 1907;22:541.
32. Wolbach SB, Binger CAL. Notes on a filterable spirochete from fresh water. *Spirocheta biflexa* (new species). J Med Research 1914;30:23-25.

33. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease. (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). J Exp Med 1916; 23:377-402.
34. Hübener, Reiter. Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. Mitteilung I. Dtsch Med Wschr 1915;41:1275.
35. Uhlenhuth P, Fromme W. Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). Medizinischer Klinik (München) 1915;44:1202.
36. Noguchi H. The Spirochetes. The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology. Chicago: University of Chicago Press; 1928.
37. Faine S. *Leptospira* and Leptospirosis. Florida, USA 1994. CRC Press. 353.
38. Kmety E, Dikken H. Revised list of "*Leptospira*" serovars. I Alphabetical order, II Chronological order. Groningen, Netherlands 1988, University Press. Vol. 1 y 2. 28.
39. Instituto Pasteur. Welcome to the *Leptospira* Molecular Genetics Server (Citado 2010 marzo15) 2006. [www.pasteur.fr/recherche/leptospira.html](http://www.pasteur.fr/recherche/leptospira.html).
40. Wolff JW, Brom J. The genus *Leptospira* *Noguchi*. 1917. Problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. Documenta de Medicina Geographica et Tropica 1954;6: p. 78-95.
41. Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B, *Lipopolysaccharide biosynthesis in Leptospira*. J. Mol. Microbial and Biotech 2002; 2:376-380.
42. De la Peña-Moctezuma A, Bulach D, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999;177:319-326.
43. Levett P. *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev 2001;14 296-326.

44. Galloway RL, Levett PN. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:628-632.
45. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:671-673.
46. Brenner DJ, Kaufmann AF, Suelzer KR, Steigerwait AG, Rpgers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:839-858.
47. Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:705-708.
48. Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, et al. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J System Evol Microbiol* 2008;58:2305-2308.
49. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:213 e.
50. Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 2001;40:189-199.
51. Jost BH, Adler B, Faine S. Immunization with leptospiral lipopolysaccharide and polysaccharide. *Australian Microbiologist* 1988;9:414.



52. Jost BH, B. Adler, and S. Faine. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J Medi Microbiol 1989;29:115-120.
53. Bermejo A, Duarte J. Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. Ars Pharmaceutica 2003;44:121-139.
54. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. Infect Immun 2001;69:7550-7558.
55. Palmer MF, Laboratory diagnosis of leptospirosis. Medical Laboratory Sciences 1988;45:174-178.
56. Goldstein SF, Charon NW. Multiple exposure photographic analysis of a motile spirochete. Proc Nat Acad Sci 1990;87:4894-4899.
57. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infec Immun 1999;67:6572-6582.
58. Yanagawa R, Faine S. Morphological and serological analysis of leptospiral structure. Nature 1966;211:823-826.
59. Charon NW, Goldstein SF, Block SM, Curci K, Ruby JD, Kreiling JA, *et al.* Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. J Bacteriol 1992;174:832-840.
60. Lin M, Dan H, Li Y. Identification of a second flagellin gene and functional characterization of a  $\sigma^{70}$  - like promoter upstream of a *Leptospira borgpetersenii flaB* Gene. Current Microbiol 2004;48:145-152.
61. Noguchi H. Etiology of Yellow Fever. VII. Demonstration of *Leptospira icteroides* in the blood, tissues, and urine of yellow fever patients and of animals experimentally infected with the organism. J Exp Medi 1919;30:87-107.
62. Johnson RC, Gary ND. Nutrition of "*Leptospira pomona*". II. Fatty acid requirements. J Bacteriol 1963;85:976-982.

63. 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.
64. Johnson CR, Gay ND. Nutrition of *Leptospira* Pomona.III. Calcium, magnesium and potassium requirements. *J Bacteriol* 1963;1963:983-985.
65. Stalheim OHV, Wilson JB. Cultivation of leptospirae. I. Nutrition of "*Leptospira canicola*". *J Bacteriol* 1964;88:48-54.
66. Johnson RC, Rogers P. 5-fluorouracil as a selective agent for the growth of leptospirae. *J Bacteriol* 1964;88:422-426.
67. Johnson RC, Rogers P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae with 8-azaguanine. *J Bacteriol* 1964;88:1618-1623.
68. Rao PJ, Larson AD, Cox CD. Catalase activity in *Leptospira*. *J Bacteriol* 1964;88:1045-1048.
69. Myers M. *Manual para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis OPS*. 1985, Centro Panamericano de Zoonosis.
70. Shenberg E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J Bacteriol* 1966;93:1598-1606.
71. Davis BD, Dubos JR. The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media. *J Exp Med* 1947;86:215-228.
72. Monahan AM, Callanan Jj, Nally JE. REVIEW PAPER: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic Leptospirosis. *Vet Pathol* 2009;46:792-799.
73. Segers RP, van der Drift A. de Nijs A, Corcione P, van der Zeijst BA, Gaastra W. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1990;58:2177-2185.
74. Segers RP, van Gestel J, van Eys GJ, van der Zeijst BA, Gaastra W. Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae. *Infect Immun* 1992;60:1707-1710.

75. Bernheimer AW, Beey RF. Copurification of *Leptospira interrogans* Serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. *Infect Immun* 1986;54:262-264.
76. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002; 70:315-322.
77. Baril C, Herrmann J, Richaud C, Margarita D, Saint Girons I. Scattering of the rRNA genes on the physical map of the circular chromosome of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *J Bacteriol* 1992;174:7566-7571.
78. Takahashi Y, Akase K, Hirano H, Fukunaga M. Physical and genetic maps of the *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae strain Ictero no.1 chromosome and sequencing of a 19-kb region of the genome containing the 5S rRNA gene. *Gene* 1998; 215:37-45.
79. Zuerner RL. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Research* 1991;19:4857-4860.
80. Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J Bacteriol* 1993;175:5445-5451.
81. Krawiec S, Riley M. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol Rev* 1990;54:502-539.
82. Herrmann JL, Baril C, Belenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1991;173:7582-7588.
83. Boursaux-Eude C, Saint Girons I, Zuerner R. *Leptospira* genomics. *Electrophoresis* 1998;19:589-592.

84. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Hookey JV. Chromosomal rearrangement and serovar conversion in *Leptospira biflexa* strains. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993;278(4):479-499.
85. 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.
86. Nascimento AL, Ko A, Martins AL, 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.
87. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, *et al.* Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *PNAS* 2006;103:14560-14565.
88. Bourhy P, Salaun L, Lajus A, Médigue C, Boursaux-Eude C, Picardeau M. A genomic island of the pathogen *Leptospira interrogans* serovar Lai can excise from its chromosome. *Infect Immun* 2007;75:677-683.
89. Galan JC, Baquero MR, Maorosini MA. High mutation rate bacteria: Risks of a high-speed life. *Infect* 2006;10:22-29.
90. Capy P, Vitalis R, Langin T, Higuët D, Bazin C. Relationships Between Transposable Elements Based Upon the Integrase-Transposase Domains: Is There a Common Ancestor?. *J Mol Evol* **1996**;42:359-368.
91. Kalambaheti T, Bulach DM, Rajakumar K, Adler B. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis. *Microbial Pathog* 1999;27:105-117.
92. Takahashi Y, Kishida M, Yamamoto S, Fukunaga M. Repetitive sequence of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae strain Ictero No. 1: A sensitive probe for demonstration of *Leptospira interrogans* strains. *Microbiolo Immun* 1999;43:669-678.
93. Boursaux-Eude C, Saint Girons I, Zuerner R. *IS1500*, an *IS3*-like element from *Leptospira interrogans*. *Microbiolo* 1995;141:2165-2173.

94. Zuerner RL. Nucleotide sequence analysis of *IS1533* from *Leptospira borgpetersenii*: identification and expression of two IS-encoded proteins. *Plasmid* 1994;31:1-11.
95. Zuerner RL, Huang WM. Analysis of a *Leptospira interrogans* locus containing DNA replication genes and a new IS, *IS1502*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215:175-182.
96. Takashima I, Yanagawa R. Failure of transformation in *Leptospira* with two genetic markers of streptomycin resistance and the ability to grow in a synthetic medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Abt I. Orig. Reihe A* 1975;231:180-186.
97. Saint Girons I, Amouriaux P, Baranto G. First isolation of bacteriophage for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. *Res Microbiol* 1990;141:1131-1138.
98. Saint Girons I, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, Hendrix RW, *et al.* The LE1 bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa-Escherichia coli* Shuttle Vector. *J Bacteriol* 2000;182:5700-5705.
99. Bao L, Qiu H, Yan J, Xie Y, Chen W. The construction and expression of recombinant shuttle plasmid with OmpL1 gene from *leptospira interrogans* serovar Lai strain 017 in Bacille Calmette-Guerin. *Chin Med Sci J* 2002;17:8184.
100. González-Pedrajo B, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje bioquímico* 2003; XXVII.
101. Koster M, Bitter W, Tommassen J. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;290:325-331.
102. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:420-430.

103. Buchana S. Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends Biochem Sci* 2001;26:3-6.
104. Binet R, Letoffe S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters-a review. *Gene* 1997;192:7-11.
105. Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* 2001;15:1725-1752.
106. Driessen AJ. *SecB*, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* 2001;9:193-196.
107. Sandkvist M. *Type II secretion and pathogenesis*. *Infect Immun* 2001;69:3523-3535.
108. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 2001;40: 271-283.
109. Plano GV, Day JB, Ferracci F. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* 2001; 40:284-293.
110. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:379-433.
111. Christie PJ, Vogel J. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 2000;8:354-360.
112. Baron C, Ocallaghan D, Lanka E. Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol Microbiol* 2002;43:1359-1365.
113. Christie PJ. Type IV secretion: intracellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* 2001;40: 294-305.
114. Henderson IR, Navarro Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 1998;6:370-378.
115. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001;69:1231-1243.

116. Jani AJ, Cotter P. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* 2010;8: 2-6.
117. Bernard CS, Brunet YR, Gueguen E, Cascales E. Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *J Bacteriol* 2010;192: 3850-3860.
118. Bitter W, Houben EN, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, Cox JS, *et al.* Systematic Genetic Nomenclature for Type VII Secretion Systems. *PLoS Pathog* 2009;5:1000507e.
119. Carlsson F, Kim J, Dumitru C, Barck KH, Carano RA, Sun M, *et al.* Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection. *PLoS Pathog* 2010;6:1000895 e.
120. Serafini A, Boldrin F, Palú G, Manganelli R. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 Conditional Mutant: Essentiality and Rescue by Iron and Zinc. *J Bacteriol* 2009;191:6340-6344.
121. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Candebroucke-Grauls CM, *et al.* Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:883-891.
122. Higgins C. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Research in Microbiology* 2001;152:205-210.
123. Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22:1-20.
124. Flores PE. Estudio del *locus gsp* del sistema de transporte tipo II de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae. *Microbiología e Inmunología*. 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: México DF. p. 46.
125. Ordóñez LL. Comparación de la organización genética de los *loci gsp* en dos cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, *Microbiología e Inmunología*. 2010, Universidad Nacional Autónoma de México: México DF. p. 48.

126. Mena BR. Análisis in silico de los genes *gspD<sub>L</sub>* y *gspE<sub>L</sub>*, del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc, *Microbiología e Inmunología* 2006, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F. p. 128.
127. Rodríguez REA. Antigenicidad de la proteína de membrana externa *GspDL*, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), *Microbiología e Inmunología*. 2007, Universidad Nacional Autónoma de México: México DF. p. 249.
128. Alcaraz SLE. Detección de la expresión de la secretina *GspDL*, del sistema de secreción tipo 2 (T2SS), de *Leptospira* mediante inmunohistoquímica, *Microbiología e Inmunología*. 2008, Universidad Nacional Autónoma de México: México DF. p. 81.
129. Vijayachari P, Ahmed N, Sugunan AP, Ghousunnissa S, Rao KR, Hasnain SE, *et al.* Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of *Leptospirosis* in India. *J Clin Microbiol* 2004;42:3575-3580.
130. Bolin CA, Cassells J, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection of swine. *J Vet Diagn Invest* 1991;3:152-154.
131. Thiermann A. *Leptospirosis*: current developments and trends. *J Am Vet Med Assoc*, 1984;184:722-725.
132. Ellis WA, Thiermann AB., Marshall RB. Proceedings of 14th World Congress on Diseases of cattle. *Genotypes of Leptospira hardjo and their role in clinical disease*. 1986.
133. Bolin CA, Zuerner R, Trueba G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am J Vet Res* 1989;50:1001-1003.
134. Torten M. *Leptospirosis*, CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A. 1. Bacterial, rickettsial and mycotic diseases, J.H. Steele, Editor. 1979, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 363-421.



135. Galton MM, Sulzert CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Applied Microbiology* 1965;13:81-85.
136. Cole JR Jr, Sulzert CR, Pursell AR. Improved Microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test 1. *Appl Microbiol* 1973;25: 976-980.
137. Cousins DV, Robertson GM, Hustas L. The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hajrido, pomona and tarassovi in cattle. *Vet Microbiol* 1985;10:439-450.
138. Hodges RT, Day .A. Bovine leptospirosis: the effects of vaccination on serological responses as determined by complement fixation and microscopic agglutination tests New Zealand. *Vet J* 1987;35:61-64.
139. OMS, *Diagnóstico de la leptospirosis y tipificación de las leptospiras*, iSerie de informes tecnicos No. 113. 1957, Organización Mundial de la Salud Ginebra.
140. Kmety E. *Faktorenanalyse von Leptospiren der Icterohaemorrhagiae und einiger verwandter Serogruppen (Factor analysis of the Icterohaemorrhagiae and some related serogroups)*. *Biologické Práce* 1967;3:67.
141. Van Eys GJ, Gerritsen M, Korver H, Schoone GJ, Kroon CCM, Terpstra WJ. Characterization of serovars of the genus *Leptospira* by DNA hybridization with hardjobovis and Icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup sejroe. *J Clin Microbiol* 1991;29:1042-1048.
142. Thiermann AB, Handsaker AL, Moseley SL, Kingscote B, New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup pomona by restriction endonuclease analysis: serovar kennewicki. *J Clin Microbiol*, 1985;21:585-587.
143. Bomfim MR, Ko A, Koury MC. Evaluation of the recombinant *LipL32* in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* 2005;109:89-94.

144. Dey S, Moham CM, Kumar TM, Ramadass P, Mainer AM, Nachimuthu K. Recombinant *LipL32* antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol* 2004;103:99-106.
145. Mariya R, Chaudhary P, Kumara AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK, Evaluation of a recombinant *LipL41* antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis* 2006;29:269-277.
146. Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant *OmpL1* protein. *J Vet Med Sci* 2005;67:249-254.
147. Hartman EG. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immun Immunopath* 1986;13:261-271.
148. Hodges RT, Carter ME, Almand KB, Weddell W, Holland JTS, Lewis SF, *et al.* An evaluation of the semi-automated complement fixation test and the microscopic agglutination test for the serological diagnosis of bovine leptospirosis. *New Zealand Vet J* 1979;27:101-102.
149. Ellis WA, O'Brien JJ, Neill SD, Hanna J. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *Vet Rec* 1982;110:178-180.
150. Sehgal SC, Vijayachari P, Subramaniam V, Evaluation of leptospira micro capsule agglutination test (MCAT) for serodiagnosis of leptospirosis. In *J Med Res* 1997;106:504-7.
151. Arimitsu Y, Matuhasi T, Kobayashi S, Sato T, Cui JJ. Serodiagnosis of leptospirosis in China by the one-point MCA method. *Epidemiol Infec* 1987;99:393-398.
152. Cook JE, Coles EH, Garner FM. Detecting leptospire in formalin-fixed hamster tissues by fluorescent antibody techniques. *Am J Vet Res* 1972;33:277-82.

153. Smith RE, Hench EC, Reynolds IM. Experimental leptospirosis in pregnant ewes. VI. Immunofluorescence in the diagnosis of fetal leptospirosis. *Cornell Vet* 1966;56:640-647.
154. Hodges RT, Ekdahl MO. Use of a fluorescent antibody technique for the serological differentiation of leptospiral serotypes in cultures and in bovine urine. *N Z Vet J* 1973;21:109-115.
155. Bolin CA, Zuerner R, Trueba G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. *Am J Vet Res* 1989;50:2004-2008.
156. Levett PN, Whittington CO. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:11-4.
157. Astudillo HM, Gonzales RA, Batista SN, Mirabal SM, Menéndez HJ. Estudio seroepidemiológico de la leptospirosis humana en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 2009;61
158. Alston JM, Broom JC. *Leptospirosis in man and animals*. Edinburgh and London 1958, E. & S. Livingstone. 367.
159. Amatredjo A, Campbell RSF. Bovine leptospirosis. *Vet Bull* 1975;43:875-891.
160. Terpstra WJ, Korver H, van Leeuwen J, Klatser PL, Kolk AHJ. The classification of sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralbl Bakteriol, Mikrobiol Hyg, Series A* 1985;259:498-506.
161. Majed Z, Bellenguer E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. *J Clin Microbiol* 2005;43:539-543.
162. Terpstra WJ, Schoone GJ, Ligthart GS, Ter Schegget J. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. *J Gen Microbiol* 1987;133:911-914.

163. Millar DB, Chappel RJ, Adler B. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridisation. *Vet Microbiol* 1987;15:71-78.
164. Fach P, Trap D, Guillou JP. Biotinylated probes to detect *Leptospira interrogans* on dot blot hybridization or by in situ hybridization. *Lett Appl Microbiol* 1991;12(5): p. 171-176.
165. Lefebvre RB. DNA probe for the detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo genotype hardjo-bovis. *J Clin Microbiol* 1987;25:2236-2238.
166. Zuerner RL, Bolin CA. Repetitive sequence element cloned from *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis provides a sensitive diagnostic probe for bovine leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1988;26:2495-2500.
167. Van Eys GJ, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MT, Schegget JT, *et al.* Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:2258-2262.
168. Gerritsen MJ, Olyhoek T, Smits MA, Bokhout BA. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. *J Clin Microbiol* 1991;29:2805-2808.
169. Alt DP, Zuerner R, Bolin CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J Am Vet Med Assoc*, 2001. 219(5): p. 636-639.
170. Zuerner RL, Bolin CA. Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Vet Microbiol* 1990;24:355-365.
171. Silbreck NW, Davies WD, Restriction endonuclease analysis of Australian isolates of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Aust Vet J* 1989;66:183-184.
172. Marshall RB, Wilton B, Robinson AJ. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. *J Med Microbiol* 1981;14:163-166.

173. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:1696-1702.
174. Djordjevic S, Hornitzky M, Ross AD, Whittington RJ. Restriction-endonuclease analysis of Australian isolates of *Leptospira interrogans* serovar hardjo from cattle with agalactia and abortion. *Aust Vet J* 1993;**70**:98-100.
175. Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006;**101**:373-378.
176. Brown PD, Levett P. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J Med Microbiol* 1997;**46**:173-81.
177. Collares-Pereira M, Korver H, Cao Thi BV, Santos-Reis M, Bellenger E, Baranton G. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiol Lett* 2000;**185**:181-187.
178. Ramadass P, Merarani S, Venkatesha MD, Senthikumar A, Nachimuthu K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. In *J Sys Bacteriol* 1997;**47**:575-6.
179. Roy S, Biswas D, Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Antigenic and genetic relatedness of *Leptospira* strains isolated from the Andaman Islands in 1929 and 2001. *J Med Microbiol*, 2003;**52**:909-911.
180. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 1997;**35**(2):339-346.
181. Resch G, Awad-Masalmeh M, Bakoss P, Jareková J, Utility of phylogenetic studies in the identification of *Leptospira* strains. *Epidemiol Infect* 2007;**135**:266-1273.

182. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reinjans M, Van de Lee T, Hornes M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4407-4414.
183. Ahmed N, Bal A, Khan AA, Alam M, Kagal A, Arjunwadkar V, et al. Whole genome fingerprinting and genotyping of multiple drug resistant (MDR) isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from endophthalmitis patients in India. *Infect Genet Evol* 2002; 1:237-242.
184. Ahmed N, Alam M, Abdul Majeed A, Asad Rahman S, Cataldi A, Cousins D, et al. Genome sequence based, comparative analysis of the fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLP) of tubercle bacilli from seals provides molecular evidence for a new species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol*, 2003; 2:93-199.
185. Carroll IM, Ahmed N, Beesley SM, Khan AA, Ghousunnissa S, Moráin CA, et al. Fine-structure molecular typing of Irish *Helicobacter pylori* isolates and their genetic relatedness to strains from four different continents. *J Clin Microbiol* 2003;41:5755-5759.
186. Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD. Development of a Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005;4.
187. Denoeud F, Vergnaud G, Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics* 2004;5.
188. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873-884.
189. Lewontin RC, Hubby JL. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of

- heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1966;54:595–609.
190. Lewontin RC. Molecular and classical biology. *Science* 1964;146: 14.
  191. Lewontin R. *The principle of historicity in evolution*. Wistar Inst Symp Monogr 1967;5:81-94.
  192. Shumaker KM, Allard RW, Kahler AL, Cryptic variability at enzyme loci in three plant species, *Avena barbata*, *Hordeum vulgare*, and *Zea mays*. *J Hered* 1982;73:86-90.
  193. Harris H. Enzyme polymorphisms in man. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1966;164:298-310.
  194. Sibley CG, Ahlquist JE. The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. *J Mol Biol* 1984;20:2-15.
  195. Wilson AC, Carlson SS, White TJ. Biochemical evolution. *Annu Rev Biochem*, 1977. 46: p. 573-639.
  196. Milkman R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 1973;182:1024-1026.
  197. Musser JM, Hewlett E, Pepler MS, Selander RK. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol* 1986;166:230-237.
  198. Musser JM, Granoff DM, Pattison PE, Selander RK. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5078-5082.
  199. Ramshaw JA, Coyne Ja, Lewontin RC, The Sensitivity of Gel Electrophoresis as a Detector of Genetic Variation. *Genetics* 1979;93:1019-1037.
  200. Kreitman M. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1983;304:412-417.
  201. Maiden MC, Bygraves Ja, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, *et al*. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3140-3145.

202. Letocart M, Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Baranton G, Perolat P. Genetic structure of the genus *Leptospira* by multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Sys Bacteriol* 1999;49:231-238.
203. Urwin R, Maiden MC. *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology*. *Trends Microbiol* 2003;11: 479-487.
204. Enright MC, Spratt BG. *Multilocus sequence typing*. *Trends Microbiol* 1999;7:482-487.
205. Tomita T, Meehan B, Wongkattiya N, Malmo J, Pullinger G, Leigh J, *et al*. Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. *Appl Environ Microbiol* 2008;74;114-124.
206. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 2004;5:86.
207. Bournoux ME, Aanensen DM, Morand S, Théraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol* 2004;4:243-252.
208. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5709-5719.
209. Chan MS, Maiden MC, Spratt BG Database-driven Multi *Locus* Sequence Typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001;17: 1077-1087.
210. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 4384-4388.
211. Bygraves JA, Urwin R, Fox AJ, Gray SJ, Russell JE, Feavers IM, *et al*. Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. *J Bacteriol* 1999;181: 5551-5556.
212. Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, *et al*. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 2000;38:4492-4498.



213. Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L, Berrón S, De La Fuente L, Vázquez JA. The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 2002;51:1102-1106.
214. Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz P, Kremastinou J, Pangalis A, *et al.* Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J Clin Microbiol* 2001;39:1235-1240.
215. Spratt B. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:312-316.
216. Perez J, Guarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol* 2010;10:325.
217. Ahmed N, Devi S, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;23:28.
218. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, *et al.* A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 2007;1:56.
219. Leon A, Pronost S, Fortier G, Andre-Fontaine G, Leclercq R. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *J Clin Microbiol* 2010;48:581-585.
220. Zamora J, Riedemann S, Montecinos MI, Cabezas X. Aislamiento en Chile de *Leptospira interrogans* serovares Hardjo y Kennewicki en bovinos aparentemente sanos. *Arch Med Vet* 1991;23:131-135.
221. Smith CR, Corney BG, MCGowan MR, McClintock CS, Ward W, Ketterer PJ. Amoxicillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating

- cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Aust Vet J 1997;75:818-821.
222. Feresu SB, Steigerwalt AG, Brenner DJ. DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. Int J Syst Bacteriol 1999;49:1111-1117.
223. Vasconcellos SA, Oliveira JCF, Morais ZM, Baruselli PS, Amaral R, Pinheiro SR, *et al.* Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, Sao Paulo, Brazil. Braz J Microbiol 2001;32:298-300.
224. Torten M, Birnbaum S, Klingberg MA, Shenberg E. Epidemiologic investigation of an outbreak of leptospirosis in the Upper Galilee, Israel. Am J Epidemiol 1970;91:52-8.
225. Vedhagiri K, Natarajaseenivasan K, Prabhakaran SG, Selvin J, Narayanan R, Shouche YS, *et al.* Characterization of *Leptospira borgpetersenii* isolates from field rats (*Rattus norvegicus*) by 16S rRNA and lipL32 gene sequencing. Braz J Microbiol 2010;41:150-157.
226. Luna AMA, Moles CLP, Gavaldón RD, Vásquez NC, Salazar GF. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Rev Cubana Med Trop 2005;57: 28-31.
227. Moles CLP, Cisneros PMA, Gavaldón RD, Rojas SN, Torres BJI. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev Cubana Med Trop 2002;54: 24-27.