

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

Diseño, optimización y evaluación de la utilidad de los principales métodos de tipificación para el estudio epidemiológico de leptospirosis

Noelia Landolt

Director de Tesis: Norma Bibiana Vanasco

Co-director de Tesis: Guillermo García Effron

Lugares de realización: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

“Dr. Emilio Coni” – INER – ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”

Laboratorio de Leptospirosis - Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas –

Universidad Nacional del Litoral

-2025-

2 AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me acompañaron durante este proceso, en los aspectos académicos y en lo personal.

-Agradezco a mi directora Bibiana y mi co-director Guillermo, por darme la oportunidad de hacer el doctorado, por confiar en mí, por brindarme sus conocimientos y experiencia, y por guiarme durante todo este recorrido académico.

-A la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica Ciencias Biológicas, a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”) y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER “Dr. E. Coni”), por la formación académica, por el financiamiento y las oportunidades recibidas.

-A mis compañeras del laboratorio de Leptospirosis, Yosena, Fernanda, Paulina y Leticia. Gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme con una sonrisa, por aconsejarme y brindarme todos sus conocimientos y experiencia. Fueron una gran compañía, en lo académico y en lo personal. Muchas gracias también a Nazarena, que ya no forma parte del equipo, pero estuvo en el inicio de este proyecto y me brindó su colaboración de forma desinteresada. A todo el Laboratorio del Coni: a Gabriela, jefa del laboratorio, y a todos los compañeros, los que están y los que se fueron. ¡Muchas gracias por la buena compañía y por la colaboración recibida!

-A la Sección Bacteriología del Laboratorio Central del Hospital J. B. Iturraspe, por la provisión de cepas ATCC.

-A mi amada familia. A mi esposo Martin, gracias por la confianza, los consejos y el apoyo incondicional. A mis dos hijas, Paulina y Felicitas, mis princesitas, los amores de mi vida. Pauli nació cuando el doctorado estaba comenzando y Feli, cuando estaba terminando. ¡Sin dudas fueron parte de todo esto!

-A mi mamá y a mi papá, por su amor incondicional, por brindarme oportunidades, por su apoyo, y por creer siempre que era y que soy capaz de todo. A mi hermano y mi nona, por su cariño y compañía. A mi suegra, a mis cuñadas, cuñados y sobrinos, por estar siempre dispuestos a colaborar. Gracias a toda la familia por ayudarme mucho con el cuidado de mis hijas, principalmente en los momentos en los que tuve que dedicarme intensamente a la tesis. A los bioquímicos de mi familia política, por su colaboración profesional desinteresada. A mis amigas, las que están cerca y lejos, por su enorme cariño. Muchas gracias a todos porque sin saber mucho de qué se trataba esto, fueron mi alivio e hicieron que pudiera cumplir mi objetivo.

¡Gracias a todos! Sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

3 APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

Landolt, N. Y., Chiani, Y. T., Pujato, N., Jacob, P., Schmeling, M. F., García Effron, G., & Vanasco, N. B. (2023). Utility evaluation of two molecular methods for *Leptospira* spp. Typing in human serum samples. *Heliyon*, 9(2), e12564. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12564>

Soncini, A.L.; Passaro, D.; **Landolt, N.Y.**; Chiani, Y.T. *Leptospira*. En: Lopardo, H.Á.; Predari, S.C.; Vay, C. (compiladores). Parte IIg. Espiroquetas. Capítulo IIg.3. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. AAM, 2021.

4 ÍNDICE

2	AGRADECIMIENTOS	2
3	APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS	3
4	ÍNDICE	4
5	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	8
6	RESUMEN.....	9
7	INTRODUCCIÓN	13
7.1	MARCO TEORICO - LEPTOSPIROSIS	13
7.1.1	Agente etiológico	13
7.1.2	Epidemiología	20
7.1.3	Clínica y tratamiento	23
7.1.4	Diagnóstico.....	26
7.1.5	Tipificación	34
7.2	SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEPTOSPIROSIS EN EL MUNDO.....	38
7.3	SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEPTOSPIROSIS EN ARGENTINA	39
8	OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	44
8.1	OBJETIVOS GENERALES	44
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
9	MATERIALES Y MÉTODOS	45
9.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ARN ribosomal 16S.....	45
9.1.1	Evaluación de la reacción de amplificación ARNr 16S	45
9.1.1.1	Detección de inhibidores de la reacción de amplificación	45
9.1.1.2	Evaluación de distintas enzimas de amplificación	47
9.1.1.3	Evaluación del límite de detección.....	48
9.1.2	Determinación de las condiciones óptimas de reacción.....	49
9.2	APLICACIÓN DEL ARNr 16S Y MLST OPTIMIZADOS EN MUESTRAS DE SUERO PARA IDENTIFICACIÓN, ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS VARIEDADES DE <i>Leptospira</i> spp.....	50

9.2.1	Muestras de suero.....	51
9.2.1.1	Extracción de ADN genómico a partir de muestras de suero.....	52
9.2.2	Aplicación de los métodos ARNr 16S y MLST optimizados en muestras de suero	52
9.2.2.1	Amplificación del gen <i>rrs</i> (ARNr 16S).....	53
9.2.2.2	Amplificación de los siete genes del esquema MLST optimizado.....	53
9.2.2.3	Electroforesis de ADN en geles de agarosa de los productos amplificados.....	56
9.2.2.4	Purificación de los productos de amplificación.....	56
9.2.2.5	Secuenciación de los productos de amplificación	56
9.2.2.6	Análisis de las secuencias	57
9.2.3	Determinación de la frecuencia relativa de las especies y serogrupos del género <i>Leptospira</i>	57
9.2.4	Georreferenciación de las especies y serogrupos del género <i>Leptospira</i>	57
9.3	EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN ARNr ribosomal 16S y MLST	58
9.3.1	Tasa de éxito de tipificación.....	58
9.3.2	Evaluación de la concordancia entre los métodos ARNr 16S y MLST	58
9.3.3	Comparación de los serogrupos identificados por MLST en las muestras de suero de fase septicémica, con los inferidos por MAT en las muestras de suero de fase inmune	59
9.3.4	Comparación de las variedades de <i>Leptospira</i> spp. identificadas en cultivos y muestras clínicas de fase septicémica.....	59
9.3.5	Evaluación de ventajas y limitaciones del ARNr 16S y el esquema MLST	59
9.4	DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESQUEMA SECUENCIAL DE REACCIONES PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DISTINTOS GRUPOS DE ESPECIES DE <i>Leptospira</i>	60
9.4.1	Microorganismos.....	60
9.4.1.1	Cepas de referencia de <i>Leptospira</i> spp.....	60
9.4.1.2	Aislamientos autóctonos de <i>Leptospira</i> spp.....	60
9.4.1.3	Cepas de la colección americana de cultivos tipo ATCC.....	61
9.4.2	Extracción de ADN genómico a partir de cepas de <i>Leptospira</i> spp. y cepas	

ATCC	61
9.4.2.1 Cuantificación de ADN	62
9.4.3 Diseño de los sets de primers y sondas	62
9.4.4 Determinación de la temperatura óptima de annealing	62
9.4.5 Determinación de las condiciones óptimas de reacción	63
9.5 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	65
9.5.1 Tampón Tris Acetato EDTA (TAE).....	65
9.5.2 Medio de cultivo <i>Ellinghausen McCullough Johnson Harris</i> (EMJH).....	65
9.5.3 Medio de cultivo Agar <i>Cysteine lactose electrolyte deficient</i> (CLDE)	66
10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
10.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ARN ribosomal 16S.....	67
10.1.1 Detección de inhibidores de la reacción de amplificación	67
10.1.2 Evaluación de distintas enzimas de amplificación	67
10.1.3 Evaluación del límite de detección.....	68
10.1.4 Determinación de las condiciones óptimas de reacción	69
10.2 IDENTIFICACIÓN DE <i>Leptospira</i> spp. EN MUESTRAS DE SUERO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS MOLECULARES ARNr 16S Y MLST OPTIMIZADOS.....	70
10.2.1 ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).....	70
10.2.2 Multilocus sequence typing (MLST)	71
10.2.3 Determinación de la frecuencia relativa de las especies y serogrupos del género <i>Leptospira</i> identificadas mediante ARNr 16S y MLST	76
10.2.4 Georreferenciación de las especies y serogrupos del género <i>Leptospira</i> identificadas mediante ARNr 16S y MLST	76
10.3 EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN ARN ribosomal 16S y MLST.....	82
10.3.1 Tasa de éxito de tipificación.....	82
10.3.2 Evaluación de la concordancia entre los métodos ARNr 16S y MLST	84
10.3.3 Comparación de los serogrupos identificados por MLST en las muestras de suero de fase septicémica, con los inferidos por MAT en las muestras de suero de fase inmune	85

10.3.4	Comparación de las variedades de <i>Leptospira</i> spp. identificadas en cultivos y muestras clínicas de fase septicémica.....	86
10.3.5	Evaluación de ventajas y limitaciones de ARNr 16S y el esquema MLST	87
10.4	DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESQUEMA SECUENCIAL DE REACCIONES PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DISTINTOS GRUPOS DE ESPECIES DE <i>Leptospira</i>	88
10.4.1	Diseño de los sets de primers y sondas	89
10.4.2	Determinación de la temperatura óptima de annealing	90
10.4.3	Determinación de las condiciones óptimas de reacción	96
11	CONCLUSIONES	101
12	BIBLIOGRAFÍA.....	104

5 ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ARNr 16S: ARN ribosomal 16S

ATCC: del inglés, *American Type Culture Collection*

CAST PCR: del inglés, *Competitive Allele-Specific TaqMan PCR*

CLDE: del inglés, *Cysteine lactose electrolyte deficient*

Ct: del inglés, *threshold Cycle*

Eco: *Escherichia coli*

EMJH: Ellinghausen McCullough Johnson Harris

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

LNRL: Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospirosis

LPS: lipopolisacárido

MAT: del inglés, *Microscopic Agglutination Test*

MLST: del inglés, *Multilocus Sequence Typing*

Pae: *Pseudomonas aeruginosa*

PCR: del inglés, *Polymerase Chain Reaction*

qPCR: del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*

Sau: *Staphylococcus aureus*

S/N: relación Señal/Ruido

ST: del inglés, *Sequence Type*

TAE: Tris Acetato EDTA

6 RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira*. La identificación del agente etiológico desempeña un papel importante en la comprensión de la epidemiología y patogenicidad de la enfermedad, y en el desarrollo de herramientas de diagnóstico y estrategias de prevención adecuadas. En los últimos años se desarrollaron métodos de tipificación independientes de los aislamientos de *Leptospira*. Entre ellos se destacan la amplificación y secuenciación del gen *rrs* que codifica para el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) y distintos esquemas MLST (del inglés Multilocus Sequence Typing). Sin embargo, pocos autores evaluaron y aplicaron estos métodos en un número relevante de muestras de sangre o suero. El suero es el tipo de muestra utilizada frecuentemente para el diagnóstico de leptospirosis. Por lo tanto, la aplicación de estos métodos en estas muestras representa una oportunidad para mejorar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en contextos donde el aislamiento de *Leptospira* spp. es limitado o inviable. En Argentina, la obtención de muestras clínicas para el primocultivo de *Leptospira* spp. es poco frecuente y la información disponible respecto a las especies y serogrupos que causan enfermedad humana se basa en el análisis impreciso de los títulos de MAT.

Los objetivos generales de este estudio fueron: 1) Optimizar la tipificación molecular de *Leptospira* spp. para poder aplicarla directamente sobre muestras clínicas humanas (suero y/o sangre entera) y 2) Evaluar la utilidad de la tipificación molecular para conocer la frecuencia relativa de las variedades de *Leptospira* spp. circulantes, en pacientes de Argentina con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016, y su distribución espacial.

En la etapa de optimización de la reacción de amplificación de punto final del gen *rrs* - 16S ARNr no se detectaron inhibidores. El límite de detección de la reacción resultó 10^3 *Leptospira* sp./ml., y no se modificó con las diferentes enzimas de amplificación y condiciones de reacción evaluadas. Para aplicar y evaluar la utilidad de los métodos ARNr 16S y MLST se emplearon 228 muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina durante el período 2005-2016. Las muestras se seleccionaron al azar de un panel de sueros preexistente. Ambos métodos, basados en reacciones PCR de punto final, se ensayaron en todas las muestras, en paralelo, a ciegas y sin emplear ningún otro método molecular de tamizaje. Las especies causantes de leptospirosis se identificaron en 52/228 muestras y correspondieron a *L. interrogans* (50, 98.1%) y *L. borgpetersenii* (1, 1.9%). En 26 muestras se identificaron sólo con ARNr 16S, en 24 con ARNr 16S más MSLT, y en 2 sólo con MLST. En 26/228 muestras se amplificaron los 7 genes del esquema MLST y se asignaron 8 STs (del inglés: *sequence type*) diferentes. En dos muestras, los STs asignados resultaron híbridos o ambiguos (ST140 y ST37/118) y sólo permitieron la tipificación a nivel de especie. En las 24 muestras restantes, también se identificaron los serogrupos probables. Canicola se identificó en mayor proporción (ST37, 50%),

seguido de Sejroe (ST20, 16.6%), Icterohaemorrhagiae (ST17, 12.5%), Pyrogenes (ST13, 12.5%), Pomona (ST38, 4.2%) y Ballum (ST149, 4.2%). Según la ficha epidemiológica, el 71.15% de los pacientes en los que se identificó el agente etiológico de leptospirosis provenían de Santa Fe y Entre Ríos.

Las Tasas de Tipificación (TT) resultaron 21.9% para el ARNr 16S y 11.4% para el MLST, las que resultaron aceptables en el contexto de este estudio, considerando que no se realizó un tamizaje molecular. Se observó una tendencia positiva de las TT durante el período de estudio. El grado de acuerdo entre los resultados positivos y negativos del ARNr 16S y MLST resultó moderado (κ : 0.5665, IC 95%: 0,4289-0,7041). Por otro lado, los tres serogrupos identificados con mayor frecuencia en las muestras de suero de fase septicémica mediante MLST, coincidieron con los serogrupos inferidos mediante el análisis de los títulos de MAT en las muestras de suero de fase inmune. Al comparar los resultados de genotipificación en pacientes con leptospirosis confirmada (n=8), se identificaron las mismas especies y serogrupos en los aislamientos y las muestras de suero de fase septicémica, excepto en el serogrupo de un caso. El método ARNr 16S presenta mayores ventajas que el MLST respecto a las tasas de tipificación, costos y tiempo de ejecución. Sin embargo, el último método ofrece mayor resolución taxonómica e identifica el serogrupo causante de leptospirosis en muestras de suero. En este estudio, se propuso amplificar los genes *rrs* (ARNr 16S) y *glmU* (MLST) en paralelo y completar el esquema MLST sólo en muestras positivas para *glmU*, para usar eficientemente los insumos de laboratorio y acelerar las etapas de ejecución.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio y las limitaciones de los métodos aplicados, se diseñó un esquema secuencial de 4 reacciones qPCR. Este se basó en la amplificación de distintas regiones del gen *rrs* para identificar el género *Leptospira* en primera instancia, luego la especie *L. interrogans* y, por último, especies patógenas e intermedias, sin requerir de secuenciación. Se obtuvieron resultados satisfactorios en los ensayos de optimización de las reacciones de identificación de género y *L. interrogans*. En cambio, los ensayos de optimización de las reacciones de identificación de especies patógenas e intermedias no resultaron según lo esperado. Por esto, resulta conveniente profundizar los ensayos de validación.

Este estudio es uno de los primeros en aplicar y evaluar la utilidad de dos métodos de genotipificación (ARNr 16S y MLST) en muestras de suero, para identificar especies y serogrupos de *Leptospira* que causaron enfermedad en Argentina durante un período de 12 años. Los mismos se aplicaron en paralelo, sin requerir tamizaje molecular previo ni aislamientos. Considerando estos resultados, el esquema secuencial qPCR diseñado resulta ser un método prometedor para la identificación de grupos de especies de *Leptospira*. Si bien aún se encuentra en fase experimental y requiere más pruebas de validación, ofrece ventajas como la reducción de costos y tiempos de ejecución. Además, se adapta fácilmente a diferentes escenarios epidemiológicos y necesidades de diagnóstico, y puede utilizarse para el tamizaje molecular

previo a la aplicación de técnicas taxonómicas de mayor resolución. En conjunto, los hallazgos de esta tesis contribuyen a fortalecer la epidemiología molecular de la leptospirosis en Argentina y proporcionan herramientas para la vigilancia de la enfermedad y la toma de decisiones en salud pública.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. The identification of the etiological agent plays an important role in understanding the disease epidemiology and pathogenicity, and in the development of appropriate diagnostic tools and prevention strategies. In recent years, culture-independent typing methods for *Leptospira* have been developed. Among them are the amplification and sequencing of the *rrs* gene, which encodes 16S ribosomal RNA (16S rRNA), and different Multilocus Sequence Typing (MLST) schemes. However, few authors evaluated and applied these methods in a relevant number of blood or serum samples. Serum is the most commonly used sample type for diagnosing leptospirosis. Therefore, applying these methods to serum represents an opportunity to improve the disease epidemiological surveillance in settings where *Leptospira* spp. isolation is limited or unfeasible. In Argentina, human sample collection for primary culture of *Leptospira* spp. is infrequent, so the available information about the species and serogroups causing human infections is limited and is mainly based on the imprecise MAT titers.

The general objectives of this study were: 1) To optimize *Leptospira* spp. molecular typing for direct application to human clinical samples (serum and/or whole blood) and 2) To evaluate the molecular typing utility to determine the relative frequency of circulating *Leptospira* strains, in patients from Argentina with confirmed leptospirosis during the period 2005–2016, and their spatial distribution.

In the optimization stage of the endpoint PCR targeting the *rrs* gene - 16S rRNA no inhibitors were detected. The detection limit of the reaction was 10^3 *Leptospira* sp./ml, and was not modified with the different amplification enzymes and reaction conditions evaluated.

To apply and evaluate the usefulness of the 16S rRNA and MLST methods, 228 septicemic-phase serum samples of patients with confirmed leptospirosis in Argentina during the period 2005-2016 were used. Samples were randomly selected from a pre-existing serum panel. Both methods, based on end-point PCR reactions, were tested on all samples, in parallel, blindly and without any molecular screening test. The causative species of leptospirosis was identified in 52/228 samples, corresponding to *L. interrogans* (50, 98.1%) and *L. borgpetersenii* (1, 1.9%). Species were identified only by 16S rRNA in 26 samples, by 16S rRNA and MSLT in 24, and only by MLST in 2. The 7 genes of the MLST scheme were amplified in 26/228 samples and 8 different STs (sequence type) were assigned. The assigned STs were hybrid or ambiguous (ST140 and ST37/118) in two samples and only typified the causative species. In the remaining 24 samples,

the probable serogroups were also identified. Canicola was the most frequent (ST37, 50%), followed by Sejroe (ST20, 16.6%), Icterohaemorrhagiae (ST17, 12.5%), Pyrogenes (ST13, 12.5%), Pomona (ST38, 4.2%), and Ballum (ST149, 4.2%).

According to the epidemiological registry, 71.15% of patients with a successfully identified etiologic agent came from Santa Fe and Entre Ríos.

The 16S rRNA and MLST typing rates (TR) were 21.9% and 11.4%, respectively, and were acceptable in the context of this study, considering that molecular screening was not performed. A positive trend was observed in both TR during the study period. The degree of agreement between positive and negative results of 16S rRNA and MLST was moderate (κ : 0.5665, 95% CI: 0.4289-0.7041). On the other hand, the three most frequently serogroups identified in septicemic-phase serum samples by MLST coincided with the serogroups inferred in immune-phase serum samples by MAT titers. When comparing the genotyping results of culture-proven cases (n=8), the same species and serogroups were identified in the septicemic-phase samples and corresponding isolates, except for the serogroup of one case.

The 16S rRNA method offers greater advantages than MLST in terms of typing rates, costs, and execution time. However, MLST offers higher taxonomic resolution and identifies the causative serogroup in serum samples. In this study, we proposed to amplify the *rrs* (16S rRNA) and *glmU* (MLST) genes in parallel and complete the MLST scheme only on *glmU*-positive samples, to efficiently use laboratory supplies and speed up execution stages.

Considering the results obtained in this study and the limitations of the applied methods, a sequential scheme of 4 qPCR reactions was designed. This was based on the amplification of different regions of the *rrs* gene to identify *Leptospira* genus first, then *L. interrogans*, and finally pathogenic and intermediate species, without requiring sequencing. Satisfactory optimization results were obtained in the identification reactions of the genus *Leptospira* and *L. interrogans*. However, the optimization tests for the pathogenic and intermediate species identification did not yield the expected results. Therefore, further validation tests are required.

This study is one of the first to apply and evaluate two genotyping methods (16S rRNA and MLST) in serum samples to identify *Leptospira* species and serogroups that caused disease in Argentina over a 12-year period. These were applied in parallel, without requiring prior molecular screening or isolation. Considering these results, the designed sequential qPCR scheme appears to be a promising method for identifying groups of *Leptospira* species. Although it is still in the experimental phase and requires further validation testing, it offers advantages such as reduced costs and execution times. Furthermore, it is easily adaptable to different epidemiological scenarios and diagnostic needs and can be used for molecular screening prior to the application of higher-resolution taxonomic techniques. The findings of this thesis contribute to strengthening the molecular epidemiology of leptospirosis in Argentina and provide tools for disease surveillance and public health decision-making.

7 INTRODUCCIÓN

7.1 MARCO TEORICO - LEPTOSPIROSIS

7.1.1 Agente etiológico

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a humanos y animales, es causada por bacterias que pertenecen al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, género *Leptospira* (Sykes et al., 2022; World Health Organization, 2003). La familia Leptospiraceae incluye, además, otros dos géneros: *Turniella* y *Leptonema* (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

Morfología

El género *Leptospira* comprende espiroquetas Gram-negativas delgadas, (Silva-Ramos et al., 2022), helicoidales y móviles, de 0.15 µm de diámetro y 10-20 µm de longitud. Estas bacterias presentan una envoltura celular similar a la de las bacterias gramnegativas, con una membrana interna y pared celular de peptidoglicano que están estrechamente asociadas, y recubiertas por una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteínas en la superficie (Picardeau, 2017). El LPS constituye el principal antígeno para el reconocimiento de la bacteria por el sistema inmunitario del hospedero (Verma et al., 2020) y contribuye a su patogenicidad (Karpagam & Ganesh, 2020).

Leptospira spp. presenta dos flagelos periplásmicos, uno por extremo celular, dentro del cuerpo celular helicoidal (Nakamura, 2022). Los endoflagelos se insertan en el periplasma, en cada polo de la célula, y se extienden hacia el centro de la célula sin superponerse (Picardeau, 2017). La morfología del extremo celular depende de la dirección de giro de los flagelos: adopta una forma de "gancho" si giran en sentido antihorario y forma de "espiral" si giran en sentido horario (Nakamura, 2022). En general, los flagelos bacterianos se componen de tres subestructuras principales: el cuerpo basal (que funciona como un motor rotatorio transmembrana), un gancho flexible (a través del cual el filamento propulsa a la bacteria cuando es rotado por el motor) y el filamento (que está conectado al cuerpo basal por el gancho). Los filamentos de las espiroquetas son complejos y constan de un núcleo interno y una capa externa (también conocida como vaina), y, en el caso de *Leptospira interrogans*, están compuestos por al menos siete proteínas. Además, en los polos celulares cerca del motor flagelar, se encuentran quimiorreceptores que detectan varios sustratos y adaptan la dirección de la rotación flagelar según las condiciones ambientales; lo que explicaría el cambio rápido en la dirección de nado de las especies de *Leptospira* (Picardeau, 2017).

En la Figura 1 se observa la morfología celular, la arquitectura de la pared celular de *L. interrogans* y la rotación del endoflagelo.

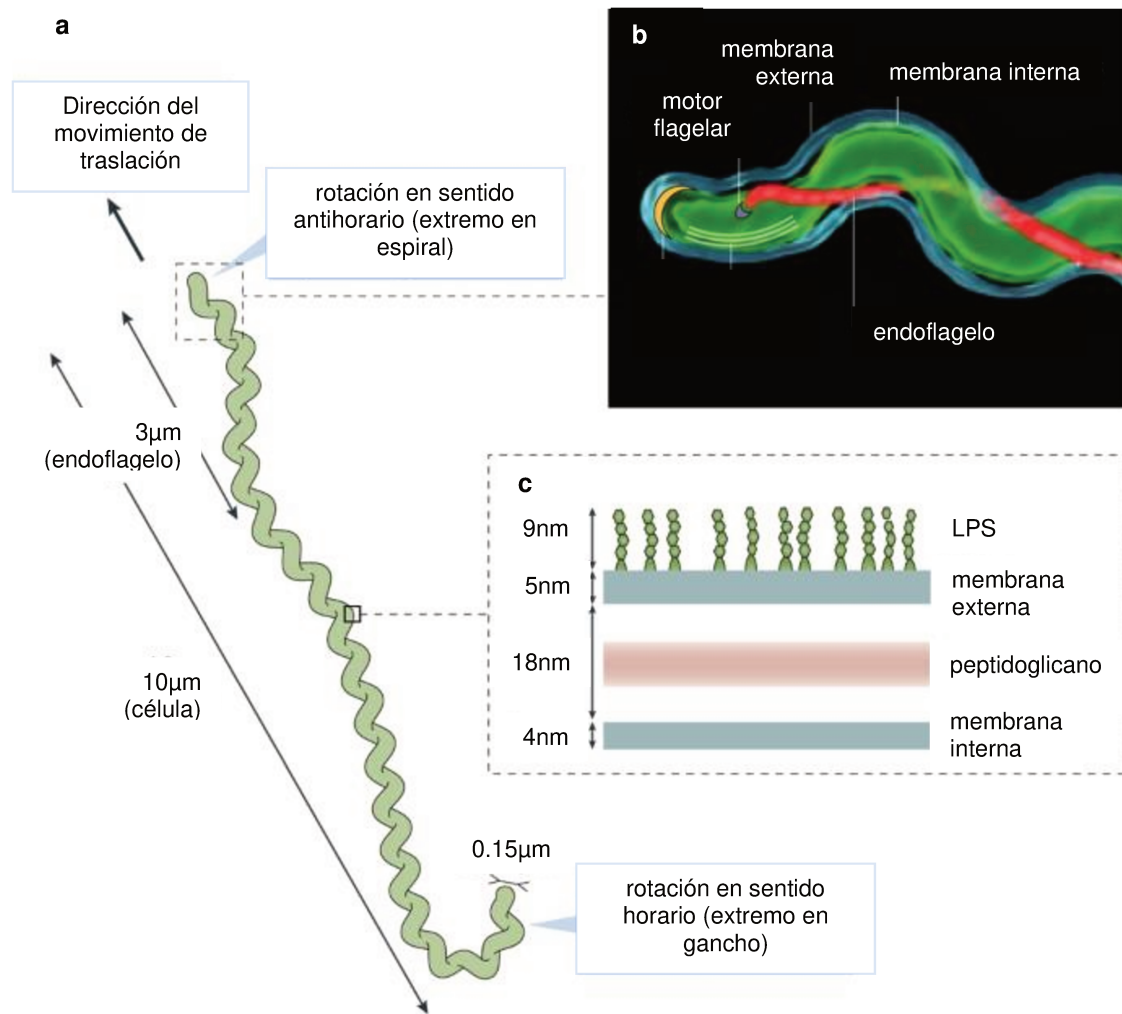


Figura 1: Morfología celular y arquitectura de la envoltura de *L. interrogans*. a: Morfología de *Leptospira interrogans*, rotación del endoflagelo y movimiento. b: Criotomografía electrónica de *Leptospira* spp. c: Diagrama de la pared celular de *Leptospira* spp. Figura modificada de Picardeau (2017).

La motilidad de los microorganismos patógenos suele estar implicada en la invasión, la migración dentro del huésped y el desarrollo de la enfermedad (Abe et al., 2023). *Leptospira* spp. presenta dos modos de motilidad, *swimming* y *crawling* (Nakamura, 2022). En el modo *swimming*, la configuración del cuerpo celular es asimétrica, el extremo anterior y posterior del cuerpo celular bacteriano presenta una forma de espiral y la otra, de gancho. De esta manera, la bacteria se impulsa unidireccionalmente. En cambio, la bacteria gira sin migración neta cuando presenta una morfología simétrica (es decir, espiral-espiral o gancho-gancho). La morfología del extremo celular cambia frecuentemente con la inversión del giro, lo que permite que la célula cambie la dirección de natación. La eficiencia de movimiento de *Leptospira* spp. mejora hasta en un 100 % en fluidos viscoelásticos gelatinosos, lo que resulta en un aumento de la velocidad de natación (Nakamura, 2022).

Por otro lado, se denomina “*crawling*” al movimiento de la bacteria sobre una superficie lisa (Nakamura, 2022). Es un movimiento completamente deslizante dependiente de la membrana

externa, se genera únicamente mediante la rotación de la membrana externa sin la contribución directa del extremo espiral y está mediado por componentes móviles adhesivos de la membrana externa, como el lipopolisacárido (Nakamura, 2022) (Figura 2).

Si bien la movilidad tipo *swimming* estaría asociada con la patogenicidad de *Leptospira* spp., el movimiento tipo *crawling* sobre las superficies tisulares se relaciona más directamente con la adhesión bacteriana. Este último movimiento permitiría que *Leptospira* spp. interactúe con las superficies de los tejidos, aumentando la probabilidad de alcanzar una unión estrecha intracelular y favoreciendo la trans migración bacteriana a través de los de los complejos de unión celular (Nakamura, 2022).

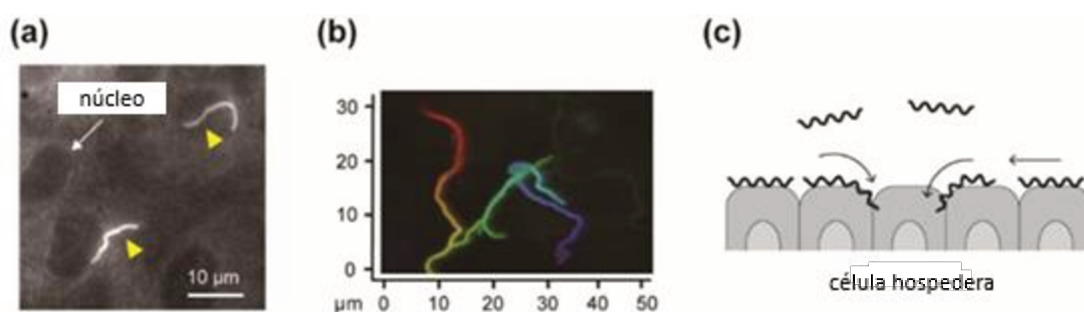


Figura 2: Movimiento tipo *crawling* de *Leptospira* spp. sobre células renales cultivadas. (a) Imagen de epifluorescencia de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en la línea celular renal de rata (NRK-52E). (b) Trayectoria de una *L. interrogans* reptando; evolución temporal en el orden rojo, naranja, amarillo, verde, azul e índigo. (c) Hipótesis de patogenicidad dependiente de la reptación. Figura modificada de (Nakamura, 2022).

Características fenotípicas y requerimientos nutricionales

Las bacterias del género *Leptospira* son bacterias aerobias obligadas y su temperatura óptima de crecimiento es entre 28 y 30 °C. Producen catalasa y oxidasa. Crecen en medios enriquecidos con vitaminas como factores de crecimiento y ácidos grasos de cadena larga asociados a albúmina que se metabolizan por β -oxidación y constituyen la única fuente de carbono (Levett, 2001; Verma et al., 2020). La capacidad multiplicativa se ve obstaculizada por ciertos factores ambientales, como la humedad, la temperatura y el pH, y la falta de disponibilidad del huésped (Verma et al., 2020).

Nueva evidencia científica respalda la multiplicación de *Leptospira* spp. en el suelo y la persistencia en un rango más amplio de condiciones de lo que se creía anteriormente. La persistencia en condiciones anóxicas sugiere que podrían cambiar su clasificación de aerobias obligadas, a anaerobias facultativas (Bradley & Lockaby, 2023).

Genoma bacteriano

Las especies de *Leptospira* tienen un genoma relativamente grande, de más de 3,9 Mb, en comparación con otras espiroquetas como *Treponema pallidum* (1.1 Mb) y *Borrelia burgdorferi* (1.5 Mb) (Picardeau, 2015). Consta de dos cromosomas circulares, uno grande de 4.332.241 pb y

uno pequeño de 358.943 pb (Ren et al., 2003; Verma et al., 2020). El cromosoma circular grande tiene una densidad génica del 75-92 % y codifica, principalmente, funciones de mantenimiento. El segundo cromosoma más pequeño contiene genes esenciales como *metF* (que codifica la metilén tetrahidrofolato reductasa) y *asd* (que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa). El genoma de *Leptospira* spp. se caracteriza por un contenido de GC de 35-42%, dependiendo de la especie. Por otro lado, en cepas no patógenas se encuentra un tercer replicón, p74, de 74 kb y 36 % de contenido GC (Picardeau, 2015).

Existen uno y dos ejemplares de cada uno de los genes codificantes de ARN ribosomal (Picardeau, 2015), dos genes *rrs* (16S) y solo un gen que codifica los ARNr 5S (*rrf*) y 23S (*rrl*), respectivamente. El gen *rrs* codifica al ARNr 16S que, junto a otras proteínas, constituye la subunidad pequeña (30S) de los ribosomas. Los genes *rml* y *rrf* codifican para el ARNr 23S y 5S, respectivamente, los que constituyen la subunidad grande (50S) del ribosoma junto a otras proteínas (Rodicio & Mendoza, 2004). El número extremadamente bajo de genes de ARNr y ARNr podría explicar el crecimiento exigente de *L. interrogans* (Ren et al., 2003). A diferencia de lo que ocurre en muchas otras bacterias, donde los genes *rrs*, *rml* y *rrf* se agrupan y cotranscriben, en *Leptospira* spp. están ampliamente dispersos en el cromosoma grande (Picardeau, 2015).

Los genes esenciales para la virulencia incluyen a: *flaB*, *rec A* (proteína flagelina), *trpE* (biosíntesis del triptófano), *hemH* (biosíntesis del hemo), *metX* (biosíntesis de la metionina), *ligB* (gen de la superficie externa), *lipL32*, *loa22* (proteína de adhesión), *fliY* (interruptor motor flagelar) y *fecA*, *feoB* (adquisición de hierro). La presencia de la proteína virulenta lipL32 en cepas patógenas pone en consideración al gen, como un posible antígeno diana para el diagnóstico temprano de la leptospirosis (Verma et al., 2020).

Taxonomía

La taxonomía del género *Leptospira* es compleja (Rajapakse, 2022). Antes de la década de 1990, el género *Leptospira* se dividía en dos grupos según la patogenicidad: "interrogans" (más tarde, *Leptospira interrogans* sensu lato) que incluía a la mayoría de las cepas patógenas y "biflexa" (posteriormente, *Leptospira biflexa* sensu lato) que contenía principalmente a las cepas saprófitas (Bharti et al., 2003). Estos dos grupos también diferían en sus requerimientos nutricionales y otras propiedades fenotípicas (Cerqueira & Picardeau, 2009). *L. biflexa* se diferenciaba de *L. interrogans* por su crecimiento a 13 °C, en presencia de 8-azaguanina y por su incapacidad de formar células esféricas en NaCl 1 M (Levett, 2001).

Posteriormente, ambos grupos (*L. interrogans* y *L. biflexa*) se clasificaron serológicamente en serovares según el polimorfismo del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) (García-López et al., 2023). El análisis de la prueba de absorción por aglutinación cruzada (CAAT) condujo a la definición de serovar, la unidad sistemática básica para *Leptospira* spp. Los serovares

antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos. Si bien los serogrupos carecen de estatus taxonómico, son útiles para la comprensión epidemiológica (Levett, 2001). La clasificación serológica ha permitido identificar más de 300 serovares agrupados en 26 serogrupos (García-López et al., 2023).

A partir de 1990, la aplicación de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) demostró coincidencias entre los perfiles de macrorrestricción con serotipos específicos. Luego, el análisis filogenético de hibridación ADN-ADN y ARN ribosomal 16S, dividieron al género *Leptospira* en tres clados distintos que agrupaban 22 especies. Un clado incluía a 10 especies patógenas que podían infectar y causar leptospirosis en humanos y animales. Otro clado incluía especies intermedias aisladas en humanos y animales, que podían causar manifestaciones clínicas leves de la enfermedad. El tercer clado, incluía especies saprófitas que no causaban enfermedad (Picardeau, 2017).

El surgimiento de la secuenciación de ADN de alto rendimiento cambió la taxonomía bacteriana, especialmente en las bacterias exigentes como *Leptospira* spp. El aumento progresivo de las secuencias disponibles permitió una clasificación taxonómica más precisa (Vincent et al., 2019). El número de nuevas especies de *Leptospira* aumentó rápidamente debido al creciente interés en los estudios metagenómicos y de las comunidades microbianas del suelo, y a la disponibilidad de la secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés *Whole Genome Sequencing*) (Koizumi & Picardeau, 2020). El número de especies aumentó de 22 en 2018, a 64 en 2019 (Koizumi & Picardeau, 2020). En la actualidad, son 69 las especies reconocidas por “*International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae*” (Fernandes et al., 2022; Koizumi & Picardeau, 2020; Picardeau, 2023). Si bien se reportaron nuevas especies luego de la última reunión en 2024, todavía no han sido reconocidas por el Comité.

Gracias a la gran cantidad de especies nuevas, se redefinieron los tres clados tradicionales en dos clados principales y cuatro subclados. Los dos clados principales son: “Saprófitas - S” que contiene especies aisladas del ambiente natural y no son responsables de infecciones, y “Patógenas - P” que contiene todas las especies responsables de infecciones en humanos y/o animales, más especies ambientales para las cuales aún no se ha demostrado el estado de virulencia. Los cuatro subclados son: P1 (anteriormente descrito como el grupo de patógenas); P2 (anteriormente descrito como el grupo intermedias), S1 (anteriormente descrito como el grupo de saprófitas) y S2 (un nuevo subclado). Las especies del nuevo subclado S2 poseen características fenotípicas de las saprófitas S1 (Vincent et al., 2019). Actualmente, se incluyen 20 especies en el subclado P1, 21 en P2, 23 en S1 y 5 en S2 (Hamond et al., 2025). En la Figura 3 se observa el árbol filogenético de las 68 especies de *Leptospira* descritas hasta el año 2021. Este árbol incluye a *L. dzianensis* y *L. putramalaysiae* que son sinónimos heterotípicos de *L. yasudae* y *L. stimsonii*. Luego, Fernandes et al. (2022) reportó a *L. sanjuanensis* en el subclado P1 (Figura 4).

La correlación entre los sistemas de clasificación serológica y genotípica es deficiente, un serogrupo determinado se encuentra a menudo en varias especies de *Leptospira* (Cerqueira & Picardeau, 2009a). Por ejemplo, los serovares del serogrupo Bataviae se encuentran en *L. interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kirschneri* y *Leptospira noguchii* (Verma et al., 2020). La falta de correlación entre los sistemas de clasificación sugiere que los genes que determinan el serotipo podrían transferirse horizontalmente entre especies (Cerqueira & Picardeau, 2009a). También se sugiere que las cepas patógenas podrían haber evolucionado a partir de un ancestro ambiental, mediante la transferencia lateral de genes asociados con la adaptación a nuevos hospederos (Vincent et al., 2019). A pesar de la falta de correlación entre los dos sistemas de clasificación, ambos se utilizan en forma conjunta (Cerqueira & Picardeau, 2009a) debido a que algunos serovares se asocian con reservorios animales particulares (Bharti et al., 2003).

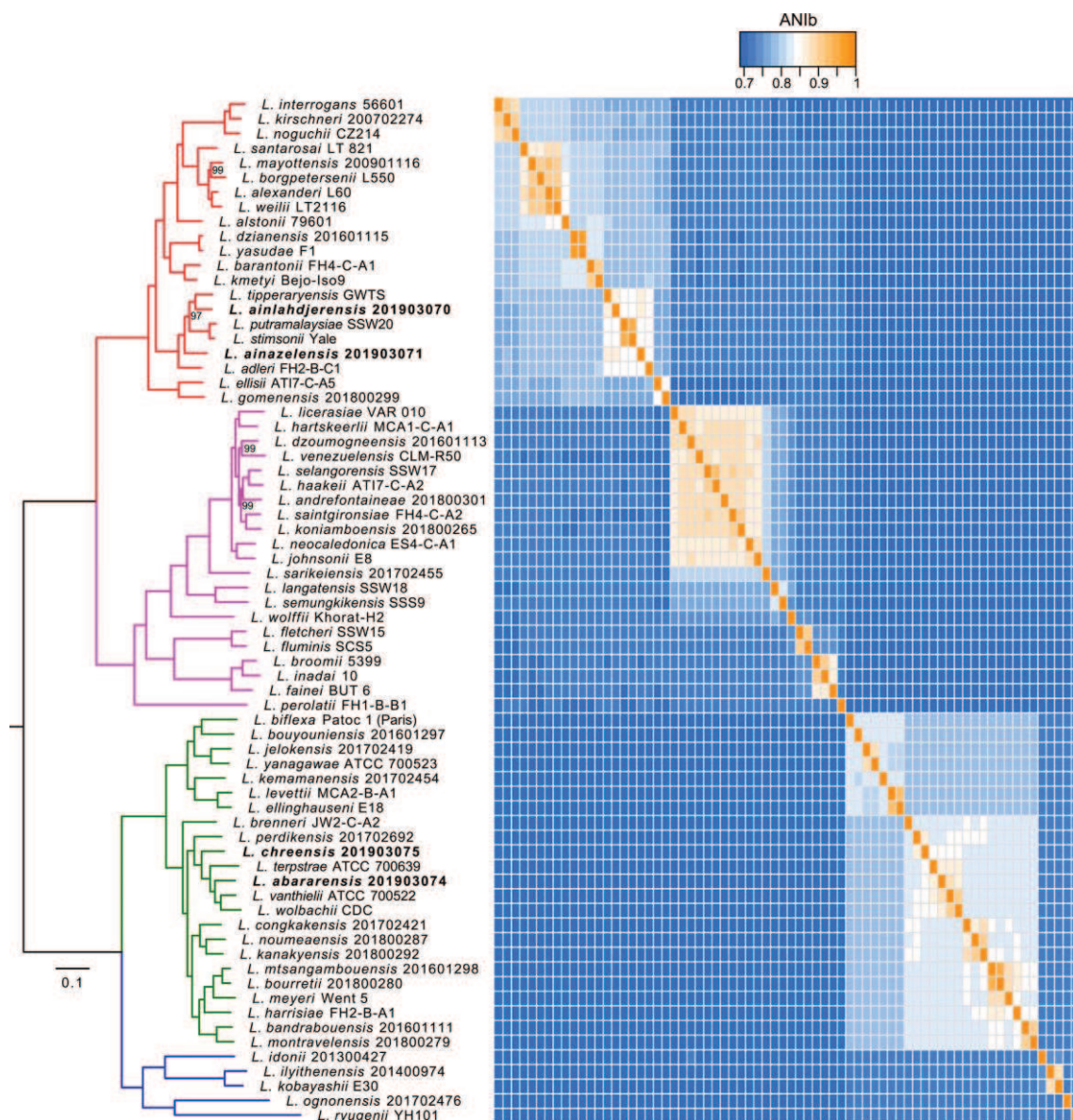


Figura 3: Árbol filogenético basado en las secuencias de genes softcore. La matriz representa los valores de ANIb calculados para todas las secuencias genómicas. Las ramas están coloreadas según su pertenencia a los cuatro subclados principales: P1 (rojo), P2 (morado), S1 (verde) y S2 (azul). Solo se muestran los valores de bootstrap inferiores a 100. Figura modificada de (Korba et al., 2021)

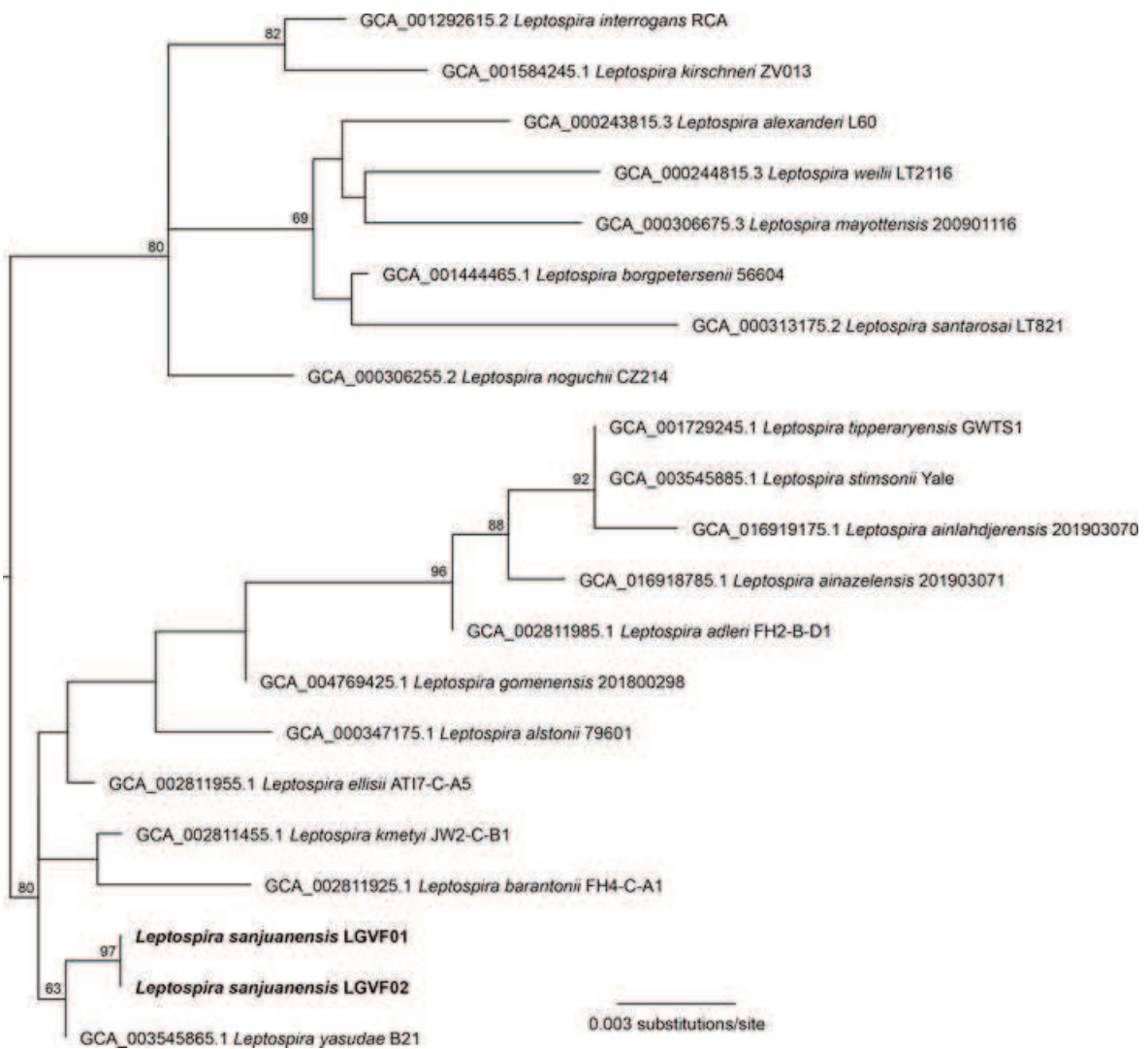


Figura 4: Árbol filogenético de secuencias completas de ARNr 16S, de las especies patógenas del subclado P1. Figura modificada de Fernandes et al. (2022).

7.1.2 Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial (Bradley & Lockaby, 2023), que se presenta en diversos entornos epidemiológicos y afecta principalmente a poblaciones vulnerables (Costa et al., 2015). Los patrones de morbilidad o mortalidad de leptospirosis a lo largo de los gradientes urbanos-rurales son indicativos de las vías de transmisión y los factores que contribuyen a la persistencia ambiental. En general, las tasas de leptospirosis deberían ser mayores donde hay una alta población de individuos infectados y una alta población de individuos susceptibles (Bradley & Lockaby, 2023).

La leptospirosis afecta a muchas especies de animales domésticos y salvajes (Soo et al., 2020). Los roedores son portadores asintomáticos de determinados serovares de *Leptospira* spp. En cambio, algunos animales susceptibles pueden desarrollar manifestaciones graves de la enfermedad al ser infectados con *Leptospira* spp. y luego, tras recuperarse de la misma, retener a las bacterias en sus riñones y eliminarlas al medio ambiente a través de la orina (Abe et al., 2023).

La bacteria continúa su ciclo vital en el medio ambiente y puede ser adquirida por un nuevo hospedero (Soo et al., 2020). Los humanos son hospederos accidentales y corren mayor riesgo al trabajar o vivir en entornos cercanos a estos animales (Rajapakse et al., 2015). La transmisión a los humanos puede ser directa, por la manipulación y contacto con animales infectados o sus tejidos y fluidos corporales; o indirecta, por contacto con agua o suelo contaminados con la bacteria (Karpagam & Ganesh, 2020; Rajapakse et al., 2015). La transmisión por contacto directo es comparativamente menor que por contacto indirecto (Karpagam & Ganesh, 2020). Las infecciones generalmente ocurren a través de abrasiones o heridas en la piel o por contacto con las mucosas (Bradley & Lockaby, 2023).

Los factores de riesgo de la enfermedad incluyen la alta densidad de animales reservorios, factores ambientales, ocupacionales y recreativos. Para erradicar la endemidad de la leptospirosis, es necesario abordar todos estos factores (Soo et al., 2020).

- Los animales reservorios son aquellos que permanecen relativamente asintomáticos a pesar de estar infectados, retienen las bacterias dentro de sus túbulos renales y ocasionalmente liberan algunas de ellas a través de la orina.

Los roedores son los principales reservorios en zonas urbanas, en particular las ratas, que pueden ser portadoras del serogrupo Icterohaemorrhagiae. Los roedores también pueden ser portadores de los serogrupos Copenhageni, Bim y Ballum (Soo et al., 2020). La rata negra (*Rattus rattus*) y la rata parda (*Rattus norvegicus*) se consideran las fuentes más importantes de leptospirosis. Estas ratas prosperan junto con las poblaciones humanas de todo el mundo, tanto en entornos urbanos como rurales. Son hospederos comensales asintomáticos, con infecciones persistentes y excreción del patógeno en niveles que superan a muchos otros hospederos (7×10^7 bacterias por día). Las ratas desempeñan un papel importante en la transmisión de la enfermedad en entornos urbanos, particularmente en comunidades de bajos ingresos e históricamente, se vinculan a brotes humanos de leptospirosis en todo el mundo (Bradley & Lockaby, 2023).

Los mamíferos como el ganado vacuno, los cerdos y las cabras son reservorios potenciales en zonas rurales (Soo et al., 2020). Los bovinos y cerdos pueden sufrir alteraciones reproductivas por la infección con *Leptospira* spp., como infertilidad, parto prematuro y muerte fetal. Por esto, la leptospirosis representa una carga económica para la producción ganadera pero, además, los animales infectados pueden contaminar fuentes de agua y suelo, y transmitir la infección a los humanos (Bradley & Lockaby, 2023). Tarassovi y Hardjo son los principales serovares presentes en el ganado bovino, y Bratislava e Icterohaemorrhagiae en los cerdos ~~y Canicola en los perros~~ (Soo et al., 2020).

Los perros domésticos también son animales reservorios y participan en la propagación del patógeno a nivel mundial. A pesar de la estrecha proximidad con los humanos, los perros no se asocian a brotes, pero participan del ciclo de la enfermedad porque contribuyen a la contaminación ambiental. Los perros infectados excretan grandes cantidades del microorganismo

en la orina (1.6×10^5 bacterias por día) y la propagan a largas distancias debido a su comportamiento altamente móvil. Se ha documentado que la excreción de la bacteria dura entre cuatro y seis semanas, e incluso, varios años en algunos casos (Bradley & Lockaby, 2023). El principal serovar presente en los perros es Canicola (Soo et al., 2020).

Respecto a la fauna silvestre, en general se considera que los grandes herbívoros y los pequeños mamíferos son las especies implicadas en la transmisión y la persistencia de la leptospirosis. Sin embargo, cierta evidencia sugiere que carnívoros como lince y lobos, roedores silvestres como capibaras, castores, ardillas y ratones, también son portadores de la enfermedad. Si bien *Leptospira* spp. es un patógeno asociado con huéspedes mamíferos, existe evidencia de infección por especies patógenas y no patógenas en anfibios y reptiles no aviares (Bradley & Lockaby, 2023). También se identificaron en hospederos atípicos como algunos mamíferos marinos (Rajapakse et al., 2015). Si bien la infección afecta a muchas especies de animales silvestres, se desconoce la carga infecciosa y la tasa de excreción de la bacteria y, por lo tanto, el rol que juegan en el establecimiento y mantenimiento de las fuentes ambientales de la enfermedad. Por todo esto, es difícil establecer el impacto ambiental que provocan (Bradley & Lockaby, 2023; Soo et al., 2020).

-En cuanto a los factores ambientales, si bien la leptospirosis depende del ciclo continuo de transmisión de *Leptospira* spp. de animales infectados a no infectados, existe una creciente evidencia de que el microorganismo puede sobrevivir y ser viable a largo plazo en el ambiente (Bradley & Lockaby, 2023). Se considera que la leptospirosis es una enfermedad transmitida por el agua debido a la frecuente vinculación de brotes humanos por exposición a aguas contaminadas y porque puede aislarse *Leptospira* spp. de cuerpos de agua como estanques, ríos, lagos, charcos, manantiales, fuentes ornamentales y aguas residuales. Las especies patógenas sobreviven en agua dulce y en suelo húmedo durante semanas o años, especialmente cuando el pH es ligeramente alcalino. Por lo tanto, el contacto con suelos contaminados también representa una fuente de infección, aunque la carga biológica en el suelo está subestimada (Karpagam & Ganesh, 2020). La principal hipótesis para la aparición de brotes de leptospirosis luego de inundaciones, tormentas y precipitaciones masivas es la resuspensión de los patógenos existentes en el suelo, donde el agente etiológico es viable y puede persistir durante períodos prolongados (Bradley & Lockaby, 2023). Las lluvias frecuentes pueden arrastrar el suelo contaminado con bacterias a los cuerpos de agua, lo que aumenta el riesgo de exposición humana a la enfermedad (Li et al., 2022).

- La leptospirosis constituye un riesgo laboral para los trabajadores que están en contacto directo con animales potencialmente infectados o quienes trabajan estrechamente con sistemas de agua y suelo. Los rasguños o cortes causados por trabajos forzados proporcionan vías de entrada para el microorganismo cuando los trabajadores no cuentan con el equipo de seguridad necesario, como guantes y botas de goma (Soo et al., 2020). Los trabajadores con riesgo potencial son los ganaderos, mataderos, veterinarios, cazadores, trabajadores de tambos, científicos, agricultores,

pescadores, recolectores de basura, trabajadores de alcantarillado, trabajadores de la construcción, militares y limpiadores de aguas residuales (Bradley & Lockaby, 2023; Soo et al., 2020).

- Las actividades recreativas y deportivas que están estrechamente relacionadas con el medio ambiente como triatlones, rafting, piragüismo, natación, entre otras, también representan un riesgo potencial para quienes las realizan (Soo et al., 2020).

Actualmente se proponen múltiples estrategias de prevención y control de leptospirosis que dependen de las circunstancias ambientales y el grado de actividad humana. Las actividades para el control de roedores como mejoras en el saneamiento y la recolección de residuos, entre otras, son estrategias de salud pública efectivas. Otras recomendaciones adecuadas son utilizar botas y ropa protectora al estar en contacto con agua estancada, no nadar en cuerpos de agua potencialmente contaminados y evitar la exposición innecesaria a animales posiblemente enfermos, incluidas mascotas. En los trabajadores de alto riesgo, se debe concientizar sobre las vías de transmisión de la enfermedad y recomendar el uso de elementos de protección como guantes, botas y protectores oculares. Como parte de las opciones farmacológicas para la prevención se encuentra la profilaxis con doxiciclina oral y la vacunación. Algunos estudios reportan una reducción en la incidencia de la enfermedad sintomática en personas expuestas a factores de riesgo, pero los resultados de las revisiones Cochrane no respaldan la quimioprofilaxis. La inmunización de mascotas domésticas y animales de granja puede disminuir el riesgo de transmisión humana (Aranzazu Ceballos et al., 2020; Chacko et al., 2021; Galan et al., 2023).

7.1.3 Clínica y tratamiento

La infección humana por *Leptospira* spp. se produce predominantemente por el contacto de piel o mucosas erosionadas con agua o tierra húmeda contaminada con orina de animales infectados (Picardeau, 2017a). Luego de la infección, algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos, mientras que otros pueden desarrollar una enfermedad grave de rápida progresión (Picardeau, 2017).

La adherencia es el primer paso crítico para la infección, las adhesinas de *Leptospira* spp. pueden adherirse a diversos componentes del hospedero y evadir su sistema inmunitario (Soo et al., 2020). Las especies patógenas de *Leptospira* expresan proteínas superficiales (OMP, del inglés *outer membrane proteins*) que pueden promover su interacción con los receptores de la célula hospedera u otras macromoléculas, como Lsa21/32/63 y LipL32/53 que se adhieren a la fibronectina, laminina y colágeno tipo IV. Las proteínas similares a inmunoglobulinas (LigA y B) también actúan en la adherencia al hospedero (Aranzazu Ceballos et al., 2020; Picardeau, 2017). Las primeras líneas de defensa contra la infección por *Leptospira* spp. incluyen la piel intacta, el moco y la saliva (Picardeau, 2017).

Leptospira spp. inicia su proceso de infección ingresando a través de las mucosas o soluciones de

continuidad de la piel, alcanza al torrente sanguíneo y logra su diseminación hematológica. Permanece en sangre durante la fase leptospirémica o septicémica de la enfermedad, aproximadamente 8 días. *Leptospira* spp. posee enzimas invasoras como colagenasas y metaloproteasas, que permiten la rápida invasión del tracto sanguíneo, difusión a los órganos blancos y eliminación por orina (Aranzazu Ceballos et al., 2020). A diferencia de otras bacterias, la movilidad en espiral de las bacterias del género *Leptospira* les permite moverse a mayor velocidad en entornos viscosos, como el tejido conectivo (Picardeau, 2017). Las especies patógenas son ampliamente trópicas, infectan todos los órganos pero sus presiones de selección pueden variar considerablemente en diferentes compartimentos (Picardeau, 2017). Tres órganos son los principales blancos de leptospirosis en el humano, hígado, pulmón y riñón (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

Leptospira spp. inicia la respuesta inmune innata con el reconocimiento de sus antígenos por los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS) y los Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*). En los PRRs se encuentran los Receptores Tipo Toll (TLR, del inglés *Toll like receptors*) que activan la respuesta mediante el Factor Nuclear Kappa (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor-kappa B*) y el Activador de proteína 1 (AP-1, del inglés *Activator Protein 1*). Así se aumenta la producción de prostaglandinas, óxido nítrico y citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*), interferón e interleuquinas (IL) 1B, 6 y 12. Los LPS son reconocidos por TLR2/4 y se relacionan con la respuesta pirogénica, endotóxica y la toxicidad hepática directa (inductor de ictericia). Las hemolisinas, además de los LPS, inducen una amplia respuesta inflamatoria con producción de IL-1 β , IL-6 y FNT que generan un aumento de la permeabilidad vascular, y la inhibición del Factor activador de plaquetas (PAF, del inglés *Platelet Activating Factor*) que origina coagulopatía y hemorragia masiva. En los casos mortales se observa una tormenta de citoquinas, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y el FNT- α , y una respuesta inflamatoria sistémica.

Luego, la respuesta inmune adaptativa, se caracteriza por la depuración de las bacterias de la sangre y por un aumento en los títulos de anticuerpos (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

Respecto a las manifestaciones clínicas de leptospirosis, en general, los signos y síntomas son inespecíficos y se asemejan mucho a las de otras enfermedades febriles. En muchos casos, esta enfermedad no es la primera sospecha clínica durante la atención de un paciente con síndrome febril y, en regiones tropicales, suele diagnosticarse erróneamente como dengue (Aranzazu Ceballos et al., 2020; Chacko et al., 2021; Soo et al., 2020).

La infección por leptospirosis se considera bifásica debido a la ocurrencia simultánea de dos fases clínicas (leptospiremia o septicémica y leptospiurica o inmunitaria), luego del período de incubación que suele durar de 7 a 12 días (Aranzazu Ceballos et al., 2020; Verma et al., 2020).

-La fase septicémica se caracteriza por una infección aguda con fiebre repentina, cefalea intensa,

dolores musculares, náuseas, diarrea, vómitos y escalofríos (Soo et al., 2020). Esta fase finaliza en un plazo de 4 a 7 días, con mejoría clínica y defervescencia que coincide con la desaparición de la bacteria de la sangre, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y otros tejidos, con excepción del humor acuoso y el parénquima renal (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

-La fase inmune comienza con un aumento en los títulos de anticuerpos IgM y leptospiruria. Esta fase comienza, aproximadamente, el día 4 de la enfermedad y dura hasta el día 30. Se caracteriza por la reaparición de fiebre y compromiso multiorgánico (hígado, riñón, meninges). Puede ocurrir insuficiencia hepática aguda, lesión renal aguda, sangrado gastrointestinal, hemorragia pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), uveítis, meningitis aséptica, mielitis transversa, síndrome de Guillain-Barré, miocarditis y rabdomiólisis, entre otros (Aranzazu Ceballos et al., 2020). La mayoría de los pacientes se recuperan completamente con cuidados de soporte adecuados. (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

La leptospirosis también se puede clasificar según la presencia de ictericia (Aranzazu Ceballos et al., 2020) como:

-Leptospirosis anictérica: se produce en el 80-90% de los casos de leptospirosis, es leve y, en algunos casos, autolimitada sin tratamiento (Karpagam & Ganesh, 2020). Tiene un inicio abrupto en la fase septicémica, caracterizado por fiebre, mialgia, cefalea, hiperemia o hemorragia conjuntival, dolor abdominal, náuseas, emesis, visceromegalia, exantema polimórfico, mialgia, artralgia, malestar general, tos, disnea, expectoración sanguinolenta y, raramente, postración y colapso circulatorio. El 90% de los pacientes se recuperan, no experimentan enfermedad bifásica y los síntomas mejoran al final del día 7. La mortalidad es rara (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

-La leptospirosis icterica (llamada síndrome de Weil): se presenta en el 5 y 10 % de los pacientes con leptospirosis (Karpagam & Ganesh, 2020). Se caracteriza por una presentación grave que conduce a disfunción renal y hepática, colapso vascular, hemorragia grave, alteración de la consciencia y una alta tasa de mortalidad. Durante la fase aguda, puede detectarse trombocitopenia. La ictericia depende de la bilirrubina y puede estar acompañada de aminotransferasas moderadamente aumentadas. La afectación renal, con valores de creatinina entre 2 y 8 mg/dL, se caracteriza por insuficiencia renal no oligúrica asociada a hipopotasemia (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

El síndrome de hemorragia pulmonar asociado a leptospirosis (SHP) ha recibido atención recientemente y se considera potencialmente mortal a nivel mundial (Petakh et al., 2024). Se caracteriza por hemoptisis masiva, aunque el sangrado puede ser imperceptible hasta la intubación del paciente, sin afectación hepática y renal. La radiografía de tórax se presenta con opacidades alveolares confluentes o patrón en "copo de nieve" en la periferia del parénquima pulmonar (Aranzazu Ceballos et al., 2020). Los síntomas respiratorios suelen aparecer entre el cuarto y el sexto día de enfermedad y pueden causar la muerte en menos de 72 horas (Petakh et al., 2024).

Los médicos deben familiarizarse con las presentaciones clínicas dado que, el inicio temprano

del tratamiento antibiótico es importante para prevenir la progresión de la enfermedad (Petakh et al., 2024). La mayoría de los casos de leptospirosis son leves y se resuelven espontáneamente, y otros requieren la administración de antibióticos orales como doxiciclina, azitromicina, ampicilina y amoxicilina (Chacko et al., 2021). Independientemente de la duración de los síntomas, el tratamiento con antibióticos debe iniciarse tan pronto como se sospeche leptospirosis. La azitromicina o las doxiciclinas son los fármacos de elección, según las directrices estandarizadas de las distintas zonas geográficas. Se debe administrar amoxicilina y azitromicina a niños y mujeres embarazadas (Petakh et al., 2024) debido a que la doxiciclina está contraindicada en estas dos poblaciones (Chacko et al., 2021).

Además del papel terapéutico de la doxiciclina, este antibiótico puede administrarse a quienes viajan a zonas geográficas reconocidas como endémicas de leptospirosis, y en personas con actividades laborales o recreativas de riesgo (Petakh et al., 2024).

Por otro lado, el uso de vacunas para animales (ganado y animales domésticos) y personas con ocupaciones de riesgo es un método preventivo eficaz contra la leptospirosis (Petakh et al., 2024). El desarrollo de vacunas beneficia a los trabajadores de alto riesgo. Lamentablemente, las vacunas se desarrollan específicamente para algunos serovares (Verma et al., 2020).

7.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico rápido de leptospirosis en una etapa temprana de la enfermedad es importante porque permite identificar a las personas que podrían beneficiarse de la terapia antibiótica y otras intervenciones. Los microorganismos suelen estar presentes en la sangre en esta etapa, pero una vez que se produce la respuesta inmunitaria del huésped, se inicia el daño y la disfunción orgánica y los antibióticos pueden ser menos eficaces. Los pacientes con leptospirosis pueden experimentar una enfermedad grave si no se administra un tratamiento temprano (Sykes et al., 2022).

Además, un diagnóstico oportuno es fundamental para reducir la propagación de la enfermedad y detener los brotes. El conocimiento de los casos de leptospirosis puede impulsar medidas de mitigación para limitar el riesgo para los humanos, como el suministro de antibióticos profilácticos a las personas en riesgo o la implementación de medidas de control de roedores. También es fundamental para la vigilancia, para comprender plenamente la carga de la enfermedad cuya notificación es muy baja en todo el mundo (Sykes et al., 2022).

El diagnóstico de leptospirosis debe ser multifacético y no basarse en una sola prueba, sino en la consideración de múltiples factores: la posible exposición, la presentación clínica, los valores de laboratorio de rutina y los resultados de las pruebas diagnósticas específicas (Sykes et al., 2022). Un historial detallado de la exposición ocupacional o recreativa junto al de los síntomas, desempeña un papel fundamental en la confirmación de la leptospirosis, ya que sus manifestaciones clínicas se asemejan mucho a las de otras enfermedades febriles (Chacko et al., 2021; Sykes et al., 2022). En las regiones tropicales existe una alta probabilidad de diagnóstico

clínico erróneo debido a la existencia de otras enfermedades endémicas, y la falta de sospecha clínica en los países industrializados es una de las razones por las que las enfermedades zoonóticas han resurgido. Es fundamental realizar pruebas concluyentes que incluyan el diagnóstico de laboratorio (Soo et al., 2020).

Por todo esto, el diagnóstico de leptospirosis se basa en las características clínicas del paciente junto con los antecedentes de exposición al riesgo y la confirmación de laboratorio, mediante la detección del microorganismo, su ADN o serología (Rajapakse, 2022).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio de leptospirosis es esencial para asegurar la atención adecuada del paciente (Cerqueira y Picardeau, 2009). Incluye tres métodos diferentes: hallazgos generales de laboratorio, métodos directos e indirectos (Verma et al., 2020).

-Pruebas generales de laboratorio

Las pruebas generales de laboratorio son importantes porque brindan una respuesta rápida, facilitan el diagnóstico y el manejo de leptospirosis, especialmente cuando no se dispone de técnicas de diagnóstico específico en los puntos de atención o en centros cercanos (Sykes et al., 2022).

En los pacientes sospechosos se evalúan características inespecíficas mediante análisis de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (Verma et al., 2020).

En los pacientes con leptospirosis leve se observa elevación de la velocidad de sedimentación globular; elevación moderada del recuento de glóbulos blancos; leve aumento de las pruebas de función hepática como aminotransferasas, bilirrubina y fosfatasa alcalina; proteinuria, piuria y hematuria microscópica en el análisis de orina.

En los casos de leptospirosis grave se observa leucocitosis periférica con desviación a la izquierda y disminución del recuento plaquetario; función renal alterada con niveles elevados de creatinina y urea; alteración de las pruebas hepáticas con concentraciones séricas de bilirrubina que pueden alcanzar los 20 mg/dl y elevación leve o moderada de las transaminasas; niveles elevados de creatinfosfoquinasa sérica y amilasa. En LCR, recuento celular inferior a 500 células/mm³, con predominio de mononucleares, niveles de proteínas y glucosa ligeramente elevados y xantocromía en pacientes con ictericia (Toyokawa et al., 2011; Verma et al., 2020).

Estas anomalías de laboratorio no son particularmente sensibles para el diagnóstico, pero pueden ser útiles cuando están presentes y pueden proporcionar una indicación de la gravedad de la enfermedad (Sykes et al., 2022). Sin embargo, la naturaleza inespecífica de estos hallazgos solo sugiere un diagnóstico de leptospirosis y se requieren pruebas microbiológicas específicas para confirmarlo (Toyokawa et al., 2011).

Actualmente, existe un creciente interés en el papel de biomarcadores para el diagnóstico de

leptospirosis aguda, como las pruebas de proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina (PCT), y otras pruebas para evaluar la gravedad de la enfermedad, como la medición de catelicidina (Sykes et al., 2022).

-Pruebas específicas de laboratorio

Debido a la presentación inespecífica y diversa en la fase temprana de la leptospirosis, y a la naturaleza inespecífica de los hallazgos generales de laboratorio, el diagnóstico de la enfermedad depende de las pruebas específicas (Toyokawa et al., 2011). En términos generales, las pruebas diagnósticas específicas se dividen en aquellas que proporcionan evidencia directa de la infección (cultivo de *Leptospira* spp. o detección de su ADN) y pruebas que proporcionan evidencia indirecta de la infección (detección de anticuerpos) (Rajapakse, 2022). Los métodos de detección directa suelen ser más precisos en las primeras etapas de la infección, mientras que los métodos indirectos presentan mayor sensibilidad en las etapas posteriores. Es por esto que los dos tipos de métodos deben utilizarse conjuntamente para comprender la prevalencia real de la infección en cada especie hospedera (Sykes et al., 2022).

Los métodos diagnósticos de referencia para la confirmación de los casos son: el cultivo (detección directa) y la MAT- Microaglutinación (detección indirecta).

- Métodos directos

Los métodos de detección directa incluyen el cultivo, microscopía y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (Sykes et al., 2022). Estos métodos tienen mayor sensibilidad durante la fase septicémica de la enfermedad.

- Microscopía: Las espiroquetas no se visualizan con los métodos de tinción tradicionales por lo que se emplea la técnica de microscopía de campo oscuro (Chacko et al., 2021). La microscopía directa en campo oscuro se emplea para detectar la bacteria en fluidos corporales como sangre, orina y LCR. Las espiroquetas se pueden visualizar por su apariencia morfológica (bacilos delgados, brillantes y móviles) y su característica movilidad (Verma et al., 2020). Este método no es empleado de forma rutinaria, debido a su baja sensibilidad y baja especificidad (40.2 y 61.5%, respectivamente) debidas a la confusión de la bacteria con diferentes artefactos, como fibras proteicas (Aranzazu Ceballos et al., 2020). El resultado también se ve afectado por el momento de la recolección de la muestra y la pericia del personal de laboratorio. Por lo tanto, los resultados del examen microscópico directo deben ser corroborados por otros métodos de laboratorio (Toyokawa et al., 2011). La microscopía puede combinarse con tinciones de plata o inmunotinción con anticuerpos específicos, pero no es ventajosa en infecciones tempranas (Verma et al., 2020).

- Cultivo: es la prueba definitiva para el diagnóstico de la leptospirosis (Sykes et al., 2022). Se puede obtener un aislamiento de *Leptospira* spp. mediante el cultivo de materiales

clínicos como sangre, orina y LCR (Verma et al., 2020). Las muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) se deben extraer y cultivar durante los primeros 10 días desde el inicio de los síntomas mientras que, las muestras de orina después de la segunda semana (Musso & La Scola, 2013). También pueden cultivarse muestras post mortem de diversos tejidos (Toyokawa et al., 2011). La urgencia del hemocultivo una vez que aparecen los síntomas se debe a que la muestra sanguínea debe obtenerse durante la fase de leptospiremia y antes de la administración de antibióticos. Para el hemocultivo, se inoculan gotas de sangre en un medio de cultivo adecuado, como el medio EMJH (del inglés *Ellinghausen McCullough Johnson Harris*) (Toyokawa et al., 2011). Los urocultivos representan un desafío debido a su susceptibilidad a la contaminación y a que la orina excretada es tóxica para la supervivencia de *Leptospira* spp. (Musso & La Scola, 2013). Por lo tanto, los medios de urocultivo suelen complementarse con antimicrobianos para reducir el riesgo de contaminación, como 5-fluorouracilo, neomicina, ácido nalidíxico, actidiona, sulfadiazol, rifampicina y anfotericina B (Toyokawa et al., 2011). No existen medios selectivos para las bacterias del género *Leptospira* aunque el medio STAFF, que contiene una mezcla de antimicrobianos (sulfametoxazol, trimetoprima, anfotericina B, fosfomicina y 5-fluorouracilo), es muy útil para reducir la presencia de organismos contaminantes en muestras ambientales o especímenes como la orina (Sykes et al., 2022).

Los cultivos se incuban a 30 °C y se controlan periódicamente mediante microscopía de campo oscuro. En el aislamiento primario, el crecimiento de *Leptospira* spp. suele ser lento y su tiempo de generación es de aproximadamente 20 horas. Se recomienda incubar los cultivos, al menos, hasta 13 semanas. Por esta razón, el aislamiento no es útil para el diagnóstico precoz aunque constituye el diagnóstico definitivo de leptospirosis (Toyokawa et al., 2011). Además de la necesidad de medios especiales, otros factores dificultan la aplicación rutinaria del aislamiento en muchos laboratorios como la baja tasa de crecimiento y la sensibilidad baja, 20% según Goris et al. (2011) y 29% según Thaipadunpanit et al. (2011). Si bien el cultivo no es oportuno para el diagnóstico del paciente, la identificación de los aislamientos causantes de la enfermedad es esencial para mejorar las pruebas diagnósticas y mejorar la comprensión de la transmisión entre humanos, animales y el medio ambiente (Sykes et al., 2022).

- Métodos moleculares: En la actualidad existen numerosos ensayos PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) que surgieron como respuesta a la necesidad de un diagnóstico rápido de leptospirosis, en el momento de admisión del paciente (Musso & La Scola, 2013). El aislamiento de *Leptospira* spp. a partir de muestras clínicas requiere de varias semanas para su desarrollo, las pruebas serológicas actuales presentan baja sensibilidad en la fase aguda y requieren sueros pareados para el serodiagnóstico definitivo, por lo tanto, la PCR convencional y la PCR en tiempo real resultan útiles para el diagnóstico precoz de la leptospirosis (Toyokawa et al., 2011). Los ensayos PCR son capaces de aportar un diagnóstico definitivo durante la fase

aguda de la enfermedad, antes de la aparición de los anticuerpos, cuando el tratamiento antibiótico todavía es eficaz (Musso & La Scola, 2013). Pueden detectar ADN en niveles extremadamente bajos durante los primeros 5 a 10 días luego del inicio de la enfermedad. Incluso, permiten la detección de *Leptospira* spp. en pacientes que recibieron un tratamiento antimicrobiano eficaz, que resultó en cultivos sanguíneos negativos, pero que no eliminó a los microorganismos no viables (Verma et al., 2020).

Es posible amplificar ADN de *Leptospira* spp. a partir de sangre, orina, LCR, humor acuoso y tejidos (Toyokawa et al., 2011). La sangre completa en fase aguda es el mejor tipo de muestra para un diagnóstico rápido. Una vez que los microorganismos abandonan el torrente sanguíneo y se establecen en los túbulos renales, se puede intentar la detección molecular en orina (Sykes et al., 2022).

Como dianas para el diagnóstico basado en PCR, se utilizan diversos genes específicos de la bacteria, *secY*, el gen de la flagelina, *rrs*, *flaB* y *rrl*, o genes específicos de especies patógenas como *lipL32*, *lipL41*, *ligA* y *ligB* (Soo et al., 2020; Sykes et al., 2022; Toyokawa et al., 2011).

A pesar de su principal ventaja, la mayor sensibilidad, el diagnóstico de leptospirosis basado en PCR se ve limitado por su incapacidad para identificar el serotipo infectante, lo cual es importante para la vigilancia epidemiológica (Haake & Levett, 2015; Verma et al., 2020).

El método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), desarrollado para detectar *Leptospira* spp. patógenas, tiene aplicaciones potenciales como método de diagnóstico en países en desarrollo debido a que no requiere de equipos sofisticados. Este método amplifica una secuencia de ADN diana en condiciones isotérmicas, durante aproximadamente 1 hora, presenta alta especificidad y eficiencia, y los resultados pueden evaluarse a simple vista (Toyokawa et al., 2011).

- Métodos indirectos

Los métodos serológicos indirectos detectan anticuerpos contra *Leptospira* spp., aproximadamente entre 5 y 7 días después del inicio de los síntomas (Sykes et al., 2022; Toyokawa et al., 2011).

Los métodos indirectos tienen mayor sensibilidad en la fase inmune de la enfermedad. Por esto, los resultados serológicos negativos obtenidos en muestras recolectadas durante la primera semana de la enfermedad, no permiten descartar la presencia de infección. La prueba serológica debe repetirse con una muestra recolectada 7 a 14 días después del examen primario (Chacko et al., 2021). La precisión diagnóstica de las pruebas serológicas es variable. Los valores de corte para la seropositividad en una sola muestra dependen de la seroprevalencia regional (Rajapakse, 2022). La serología es una herramienta adecuada para la vigilancia de la leptospirosis humana y permite identificar poblaciones de alto riesgo (Sykes et al., 2022).

- MAT (del inglés *Microscopic Agglutination Test*):

La MAT es la técnica serológica de referencia para la confirmación de casos clínicamente sospechosos de leptospirosis (Goarant, 2016). Se desarrolló en 1918, poco después del primer aislamiento de *Leptospira* spp. y sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico serológico de la leptospirosis (Cerqueira & Picardeau, 2009). Esta prueba evalúa la capacidad del suero del paciente para aglutinar cepas vivas de *Leptospira*, debido a la presencia de anticuerpos y su interacción con antígenos vivos (Goarant, 2016; Verma et al., 2020). La prueba consiste en la incubación de diluciones seriadas de los sueros de los pacientes con un panel de cepas de *Leptospira* vivas (antígenos) (Sykes et al., 2022). La interacción antígeno-anticuerpo se mide mediante la observación de aglutinación visible al microscopio de campo oscuro (Verma et al., 2020) y el resultado se determina a través de diluciones, en forma de títulos (Aranzazu Ceballos et al., 2020). La prueba MAT detecta anticuerpos específicos de serogrupo, del tipo IgM e IgG (Toyokawa et al., 2011), que se detectan entre el sexto y décimo día luego del inicio de síntomas (Ahmad et al., 2005).

El panel de cepas de *Leptospira* utilizado en el proceso diagnóstico debe ser representativo de los serogrupos y/o serovares circulantes. Los antígenos se deben mantener viables y libres de contaminación, y además, se deben someter a controles de calidad periódicos (Agampodi & Vinetz, 2021; Sykes et al., 2022). La Tabla 1 presenta las cepas de *Leptospira* spp. recomendadas por las Organización Mundial de la Salud para utilizarse como antígenos vivos en la MAT (World Health Organization, 2003).

Es difícil confirmar la infección aguda a partir de una sola muestra de suero debido a que los anticuerpos antileptospira están presentes durante meses o años después de la infección. En general, se requieren sueros pareados para el diagnóstico definitivo mediante MAT. Debe observarse una seroconversión entre las muestras de suero de la fase aguda y la de convalecencia, de al menos cuatro veces los títulos. En zonas donde la leptospirosis es poco común, un título bajo en un paciente febril puede indicar una infección activa. Por el contrario, en zonas endémicas de leptospirosis, en un paciente sintomático se requieren títulos más altos (Toyokawa et al., 2011).

Serogrupos	Serovares	Cepa
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellonis	Castellón 3
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Copenhageni	M20
Javanica	Javanica	Veldrat batavia 46
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona
Pyrogenes	Ppyrogenes	Salinem
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
	Sejroe	M 84
	Wolffi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
Semaranga	Patoc	Patoc 1

Tabla 1: Serovares de *Leptospira* spp. recomendados por la Organización Mundial de la Salud para ser incluidos en la batería de antígenos de referencia usados para la Técnica de Microaglutinación (MAT).

Anteriormente se consideraba que el antígeno con el título más alto en la reacción MAT era el serovar infectante (Levett, 2003; Toyokawa et al., 2011). Sin embargo, la MAT tiene poca utilidad para predecir los serovares infectantes de los pacientes debido a la frecuente reactividad cruzada y reacciones paradójicas. Más bien, los títulos del serodiagnóstico por MAT pueden indicar el presunto serogrupo de *Leptospira* spp. involucrado en la infección (serogrupo presumiblemente infectante) (Levett, 2003a) y tienen valor epidemiológico para determinar la potencial exposición a reservorios animales (Aranzazu Ceballos et al., 2020). Sin embargo, no es posible obtener esta información en más de la mitad de los pacientes con leptospirosis (Cerqueira y Picardeau, 2009) y la misma puede ser sobreestimada si sólo se dispone de una única muestra de suero de la fase aguda o convalescente temprana de la enfermedad. La información del serogrupo presumiblemente infectante sólo debería utilizarse como una idea general de los serogrupos de *Leptospira* spp. presentes en la población, pero no como información confiable en pacientes individuales (Levett, 2003).

A pesar de sus desafíos técnicos, la MAT tiene gran valor epidemiológico y puede aplicarse en sueros humanos y animales, lo que aumenta su valor desde la perspectiva “Una Salud” (Sykes et al., 2022).

- Otras pruebas serológicas:

Como alternativas más accesibles, se desarrollaron diversos formatos de pruebas serológicas, incluyendo ELISA, inmunofluorescencia, hemaglutinación indirecta, aglutinación de látex, ensayos de flujo lateral y tira reactiva de IgM (Sykes et al., 2022). En general, estos ensayos son específicos de género, detectan anticuerpos IgM y/o IgG y pueden utilizarse como pruebas rápidas

de detección de anticuerpos en la infección aguda (Toyokawa et al., 2011). La detección de IgM es crucial para el diagnóstico de infecciones agudas y subagudas (Soo et al., 2020). Siempre se deben confirmar los resultados de las pruebas rápidas con las pruebas de referencia (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

-En la actualidad, existen numerosos ensayos ELISA para el diagnóstico de leptospirosis, desarrollados para la detección de IgM o IgG (Soo et al., 2020). La mayoría de los ELISA desarrollados utilizan *Leptospira biflexa* como antígeno, una especie no patógena portadora de antígenos de superficie con reactividad cruzada, que permite la detección de especies patógenas (Soo et al., 2020). Pero también existen reportes de pruebas ELISA desarrolladas con antígenos provenientes de otras especies de *Leptospira* (Vanasco et al., 2016). Las pruebas ELISA IgM son apropiadas para el diagnóstico temprano, en la fase aguda de la enfermedad pero se requiere de otra prueba para confirmar la leptospirosis (Soo et al., 2020). A diferencia de la MAT, las pruebas ELISA no requieren de antígenos vivos para el diagnóstico y proporcionan resultados numéricos objetivos (Vanasco et al., 2016).

-La aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (AMTR) es una prueba de tamiz diagnóstico que requiere, como único reactivo, un antígeno obtenido a partir de una cepa de *Leptospira* inactivada por calor. Detecta anticuerpos y la interacción antígeno-anticuerpo se visualiza sobre un portaobjeto. Es una prueba específica de género, económica, rápida, que no requiere de equipamiento o reactivos costosos. Sin embargo, presenta baja reproducibilidad inter-operador (Pujato et al., 2024; Vanasco et al., 2012).

-La prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) es otra forma de detectar la interacción antígeno-anticuerpo (específica del género) en las muestras de suero de pacientes sospechosos. La prueba funciona según el principio de la reacción de aglutinación pasiva, donde los eritrocitos adsorben el antígeno e interactúan con los anticuerpos solubles en el suero de los pacientes sospechosos. Posteriormente, se detecta el anillo granular de un complejo aglutinante en placa de microtitulación. Es un método rápido y fácil de realizar, pero en comparación con la MAT, presenta menor especificidad y sensibilidad. Además, requieren una cantidad suficiente de anticuerpos y los detecta luego de ocho días de iniciados los síntomas (Verma et al., 2020).

-Con el tiempo, pruebas como el ensayo con tira reactiva, el ensayo de inmunofluorescencia (IFA) y la inmunocromatografía, ganaron popularidad en el diagnóstico de leptospirosis (Verma et al., 2020). Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, del inglés *Lateral flow immunoassay*) presentan numerosas ventajas como el bajo costo, la portabilidad y la capacidad de realizar determinaciones en un solo paso, sin equipos o instalaciones especializadas. Se han desarrollado varias LFIA para la detección de leptospirosis con gran variabilidad en los rendimientos reportados, lo que puede atribuirse a diferencias en las variantes circulantes de *Leptospira* spp. a través de regiones geográficas (Pujato et al., 2024).

7.1.5 Tipificación

Habitualmente en microbiología, la clasificación de las bacterias se realiza según sus características fenotípicas mediante pruebas bioquímicas y la tinción de Gram. La baja diversidad fenotípica dentro del género *Leptospira* impide el uso de características de crecimiento diferencial para la diferenciación del género a nivel de especie. Solo unas pocas pruebas fenotípicas como la virulencia en modelos animales, la tasa de crecimiento a 30 °C, el crecimiento a 37 °C o 14 °C y el crecimiento en presencia del análogo de purina 8-azaguanina se pueden utilizar para separar las bacterias patógenas de las saprófitas (Vincent et al., 2019).

Los aislamientos de *Leptospira* spp. se caracterizan mediante métodos de tipificación fenotípicos-serológicos y los genotípicos-moleculares (Toyokawa et al., 2011). Si bien son métodos diferentes que aportan clasificaciones de *Leptospira* spp. que no se correlacionan, la caracterización molecular se complementa con la serológica tradicional (Ahmed, & P. Grobusch, 2012; Sykes et al., 2022).

Métodos de tipificación fenotípicos serológicos

Los métodos de tipificación fenotípicos serológicos son los más antiguos y dividieron inicialmente al género *Leptospira* en dos especies: *L. interrogans* sensu lato (cepas patógenas) y *L. biflexa* sensu lato (cepas no patógenas) (Cerqueira y Picardeau, 2009).

La clasificación serológica de los aislamientos de *Leptospira* spp. se basa en la heterogeneidad estructural del componente carbohidrato del lipopolisacárido e identifica serovares y serogrupos (Agampodi & Vinetz, 2021). Los métodos clásicos son el ensayo de aglutinación cruzada luego de la adsorción con antígenos homólogos – CAAT (del inglés: *Cross agglutination adsorption test*) y la MAT invertida (Zhang et al., 2015).

El ensayo CAAT condujo a la definición de “serovar”, considerado como la unidad taxonómica básica para *Leptospira* spp. La caracterización de los aislamientos en serovares se basa en la expresión de epitopes antigénicos de superficie expuestos en el mosaico de lipopolisacáridos (LPS), la especificidad de esos epitopes depende de la composición y orientación de sus azúcares (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Con esta prueba, dos cepas se consideran diferentes si, después de la absorción cruzada con cantidades adecuadas de antígenos heterólogos, al menos el 10% del título heterólogo permanece regularmente asociado con uno de los dos antiseros. La mayoría de los aislamientos no son identificados a nivel de serovar debido a que muy pocos laboratorios en el mundo tienen la posibilidad de implementar este método, que es engorroso y consume mucho tiempo, principalmente debido al tiempo necesario para la preparación de sueros inmunes de conejo (Cerqueira y Picardeau, 2009). Los serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos que, aunque no tienen entidad taxonómica, son ampliamente utilizados por ser muy útiles para comprender la epidemiología de la leptospirosis (Levett, 2001; Cerqueira y Picardeau, 2009).

Un método serológico alternativo que permite la identificación de los aislamientos el nivel de serogrupo es la MAT. A la inversa que la MAT empleada para el diagnóstico de leptospirosis a partir de un suero incógnita, en la MAT utilizada para tipificación se enfrenta la cepa desconocida de *Leptospira* spp. (aislamiento) con sueros de conejo hiperinmunes representativos de todos los serogrupos (Kmety & Dikken, 1993; World Health Organization, 2003). Si bien los serogrupos identificados con este método no representan una entidad taxonómica oficial, tienen el propósito práctico de agrupar los serovares con antígenos en común. Este método es más accesible que el método CAAT, pero sólo se encuentra disponible en los laboratorios de referencia.

La serotipificación es una herramienta epidemiológica útil, establecer el serogrupo o serovar causal es el primer paso para identificar reservorios y generar estrategias de control (Cerqueira & Picardeau, 2009). Aunque la identificación de serovares es importante, la tipificación molecular se utiliza ampliamente (Toyokawa et al., 2011).

Métodos de tipificación molecular

En la década de 1990, se observó una tendencia a abandonar los métodos de tipificación basados en el fenotipo y a adoptar métodos basados en el genotipo (Cerqueira & Picardeau, 2009).

Entre las pruebas moleculares utilizadas para la tipificación de aislamientos de *Leptospira* spp. se encuentran: hibridación del ADN-ADN, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE, del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), Análisis de las secuencias de ARN ribosómico 16S (ARNr 16S), Tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*), Análisis del número variable de repeticiones en tándem de locus múltiples (MLVA del inglés *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*), secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés *Whole Genome Sequencing*) y Tipificación de secuencias de múltiples locus del genoma central (cgMLST, del inglés *Core-genome multilocus sequence typing*) (Aranzazu Ceballos et al., 2020; Arent et al., 2022; Guglielmini et al., 2019). Las técnicas moleculares permitieron la reclasificación del género *Leptospira* y plantearon un importante interrogante para su taxonomía, ya que la caracterización genética mostró una baja correlación con la clasificación serológica existente (Caimi y Ruybal, 2020).

-Los métodos RFLP y PFGE fueron los primeros métodos aplicados para la caracterización de ADN pero tienen desventajas como la necesidad de volúmenes significativos del aislamiento, baja reproducibilidad y dificultad en la interpretación de los resultados (Majed y col., 2005).

-La hibridación ADN-ADN ha sido el "estándar de oro" para la delimitación de especies, no sólo en el género *Leptospira*, pero debido a que esta técnica es complicada y demandante, continuamente se desarrollan nuevas técnicas que permitan reemplazarla (Ahmed, & P. Grobusch, 2012; Arent et al., 2022).

-La introducción del análisis de la secuencia del ARNr 16S redefinió rápidamente la taxonomía

procariota debido a que, para muchos laboratorios es mucho más fácil y accesible determinar la estructura primaria del ARNr 16S, que aplicar el método de hibridación entre cadenas de ADN (Arent et al., 2022). El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio & Mendoza, 2004). El ARNr 16S es un polirribonucleótido de 1500 nucleótidos aproximadamente, con características relevantes que la convierten en una herramienta filogenética y taxonómica. Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, y su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Los cambios ocurren de una manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva, pero con suficiente variabilidad como para diferenciar los organismos más alejados y los más próximos. El tamaño relativamente largo minimiza las fluctuaciones estadísticas y la conservación de la estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Además, existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento debido a que resulta relativamente fácil de secuenciar (Rodicio & Mendoza, 2004). El análisis del ARNr 16S permite caracterizar el género *Leptospira* en especies y realizar estudios filogenéticos (Morey y col., 2006; Cerqueira y Picardeau, 2009). El análisis del ARNr 16S puede basarse en la amplificación de secuencias completas del gen *rrs*, de 1430bp (Morey y col., 2006), o de secuencias parciales de 331bp (Mérieu y col., 1992).

-Se han utilizado otros genes para discriminar especies dentro del género *Leptospira*. Estos genes incluyen *rpoB*, *gyrB* y *ligB*. Estos marcadores taxonómicos generan resultados consistentes con los obtenidos con las secuencias del gen *rrs* y agrupan a las cepas en tres grupos principales correspondientes a: especies de *Leptospira* patógenas, con patogenicidad desconocida (o intermedia) y saprófitas (Cerqueira & Picardeau, 2009).

-El método VNTR (del inglés *Variable Number of Tandem Repeat*) y su análisis MLVA permiten caracterizar aislamientos de las especies de *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii*. Según otros autores, este método permite discriminar serovares o incluso cepas dentro de un mismo serovar (Majed y col., 2005; Salaün y col., 2006).

-Otro método desarrollado para la tipificación de *Leptospira* spp. es el MLST. Se basa en la generación de secuencias de ADN a partir de genes constitutivos seleccionados, para caracterizar diferentes alelos. Esto permite la identificación de grupos de microorganismos con genotipos idénticos o altamente relacionados (Ahmed y col., 2006; Vázquez y Berrón, 2004). El MLST es un método molecular simple, que no requiere grandes cantidades de ADN purificado y que puede aplicarse de rutina para la generación de resultados confiables, reproducibles, fáciles de interpretar e intercambiar (Cerqueira y Picardeau, 2009). La tipificación de secuencias multilocus (MLST) muestra filogenias consistentes con las designaciones actuales de especies y proporciona resolución de cepas en algunas especies (Picardeau, 2017). La significativa divergencia genética

de *Leptospira* spp. dificulta el desarrollo de un sistema único, por lo que se han descrito varios esquemas diferentes de MLST para este género, utilizando 6 o 7 locus diferentes (Ahmed y col., 2006; Thaipadungpanit y col., 2007; Leon y col., 2010).

Inicialmente, sólo el esquema de Ahmed y col. (Ahmed y col., 2006) permitió la tipificación de las principales cepas patógenas pertenecientes a las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri*. Este esquema se basa en la secuenciación de los 6 genes: *adk* (adenilato quinasa), *icdA* (isocitrato deshidrogenasa), *lipL32* (lipoproteína de la membrana externa), *lipL41* (lipoproteína de la membrana externa), *rrs* (ARNr 16S) y *sec* (preproteína translocasa).

Por otro lado, Boonsilp y col. (Boonsilp y col., 2013) modificaron el esquema de 7 locus descrito por Thaipadungpanit y col. (Thaipadungpanit y col., 2007), excluyeron el locus “fadD”, e incluyeron uno nuevo, “caiB”. También modificaron las secuencias de los primers para amplificar y tipificar 7 de las 9 especies patógenas del género *Leptospira* publicadas hasta ese momento (las 2 especies que quedaban excluidas contaban con muy pocos aislamientos). El esquema se basa en la amplificación de los genes *pntA* (subunidad alfa de la NAD(P) transhidrogenasa), *sucA* (componente descarboxilasa de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa), *pfkB* (riboquinasa), *tpiA* (triosafosfato isomerasa), *mreA* (proteína determinante de la forma de bastón rodA), *glmU* (UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa) y *caiB* (carnitina deshidratasa).

El esquema de Varni et al. (2014) es una combinación de los mejores loci de otros esquemas MLST y se basa en la secuenciación de los genes: *adk*, *glmU*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *mreA* y *pntA*. Luego, estas autoras redujeron el conjunto de genes de su esquema para facilitar la tipificación de *Leptospira* spp. directamente a partir de muestras clínicas humanas. El esquema reducido se basa en la secuenciación de los genes *adk*, *lipL41* y *mreA* (Varni et al., 2018).

-En los últimos años, el creciente número de secuencias completas del genoma (WGS) proporcionó una nueva perspectiva sobre la divergencia procariota e inició la transición de la filogenia génica a la filogenia genómica (Arent et al., 2022). Las comparaciones mediante WGS comenzaron a destacar la limitada resolución taxonómica del análisis de secuencias de ARNr 16S. El gen *rrs* representa solo el 0,05 % de un genoma procariota promedio de 3 Mbp y está altamente conservado, por lo que a menudo carece de suficientes caracteres variables para realizar una inferencia filogenética robusta a nivel de especie. Existen herramientas sencillas para medir la similitud entre dos genomas a nivel de nucleótidos, la identidad media de nucleótidos – ANI, o de proteínas codificadas (identidad media de aminoácidos - AAI) de genes ortólogos (Arent et al., 2022).

La mayor accesibilidad a las secuencias genómicas completas debido a metodologías mejoradas y costos reducidos, convierte a la WGS en una opción viable como el nuevo estándar de oro para la taxonomía de *Leptospira* spp. (Picardeau, 2017). La cantidad de información útil que se puede obtener de la secuenciación del genoma completo de *Leptospira* spp. para identificar y caracterizar aislamientos es invaluable. Si bien no existe un sistema de datos estandarizado para

caracterizar y tipificar *Leptospira* spp., existe una base de datos pública que utiliza 545 genes altamente conservados obtenidos de la secuenciación de genomas completos, que puede servir como método estandarizado para caracterizar aislamientos de *Leptospira* spp. en todo el mundo. Esta base de datos fue propuesta por Guglielmini et al. (2019), quienes evaluaron la WGS como herramienta de clasificación y genotipificación de cepas de todo el género *Leptospira*, y propusieron el esquema de genotipificación MLST del genoma central (cgMLST, del inglés *Core genome multilocus sequence typing*) aplicable a todo el género *Leptospira*, incluidas las especies no patógenas.

7.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEPTOSPIROSIS EN EL MUNDO

La leptospirosis es una de las principales causas zoonóticas de morbilidad a nivel mundial, y es responsable de un número de muertes que se acerca o supera al de otras causas de fiebre hemorrágica. Se estima que causa 1.03 millones de casos y 58900 muertes cada año (Costa et al., 2015). A pesar de ser grave y potencialmente mortal, continúa siendo una enfermedad desatendida que afecta principalmente a varones jóvenes de barrios urbanos marginales y zonas rurales de países en desarrollo (Goarant et al., 2018).

Según las estimaciones, la mayor incidencia de la enfermedad se presenta en los países situados en los trópicos y representa el 73% de los casos estimados a nivel mundial. Este patrón es atribuible a las condiciones ambientales y sociales que promueven la abundancia de reservorios animales, la supervivencia de la bacteria en el suelo y las aguas superficiales, y el riesgo de exposición humana a estas fuentes de infección (Costa et al., 2015). Si bien se sabe que la leptospirosis prevalece en las regiones con clima tropical o subtropical húmedo, el cambio climático y la falta de planificación urbana hicieron emerger la enfermedad en regiones templadas (Karpagam & Ganesh, 2020). Debido al calentamiento global, el número de casos notificados en Europa está aumentando y se prevé que la enfermedad se volverá más relevante (Picardeau, 2017). La interacción entre las bacterias y los animales que pueden infectarse, mediar la transmisión zoonótica y mantener al microorganismo en el medio ambiente es compleja. Desde hace algunos años, la leptospirosis se aborda desde la perspectiva “Una Salud” (del inglés *One Health*). Este enfoque es un abordaje colaborativo, multidisciplinario e intersectorial de los riesgos de las interacciones entre humanos, animales y ecosistemas (Pham & Tran, 2022). En leptospirosis, este enfoque permite comprender mejor la epidemiología, el manejo, la vigilancia y el control de la enfermedad (Sykes et al., 2022).

En este contexto, el aislamiento de las especies y los serovares circulantes son esenciales (Cerqueira & Picardeau, 2009a). El monitoreo de las cepas circulantes que causan leptospirosis en humanos es fundamental para prevenir la propagación de la enfermedad (Sykes et al., 2022). Además, la identificación de las cepas circulantes es necesaria para el diagnóstico (para garantizar que los métodos utilizados sean capaces de detectar las cepas circulantes), la epidemiología (para

caracterizar los reservorios), la vigilancia (para detectar la aparición de nuevos genotipos) y la prevención (para el desarrollo de nuevas vacunas y evaluar la eficacia de las existentes) (García-López et al., 2023).

A pesar de esta necesidad, existe una brecha importante en el conocimiento de las variedades de *Leptospira* circulantes (Cerqueira & Picardeau, 2009a; Sykes et al., 2022). Una de las principales causas es que, históricamente, el cultivo de *Leptospira* spp. es un reto y se intenta con poca frecuencia (Cerqueira & Picardeau, 2009a; Sykes et al., 2022). Además, es una técnica lenta, laboriosa y que presenta baja sensibilidad (Bharti et al., 2003; Cerqueira & Picardeau, 2009b).

Es por esto que se requieren métodos de genotipificación de *Leptospira* spp. que resulten aptos para su aplicación directa en muestras biológicas, sumado a que sean sensibles, capaces de discriminar, fáciles de implementar y económicos (García-López et al., 2023).

En las últimas tres décadas, se aplicaron varias estrategias para la genotipificación de *Leptospira* spp. en muestras clínicas, incluidos diferentes ensayos PCR dirigidos al gen del ARNr 16S para la tipificación de especies de *Leptospira* y diferentes esquemas MLST (Agampodi et al., 2011, 2013, 2014; Ahmed et al., 2006; Boonsilp et al., 2013a, 2013b; Y. Chiani et al., 2016; Guernier et al., 2018; Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Giron, 1992; Merien et al., 1995, 2005; Perez & Goarant, 2010; Philip et al., 2020; Thaipadungpanit et al., 2007; Thaipadunpanit et al., 2011a; Varni et al., 2014; Weiss et al., 2016).

7.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEPTOSPIROSIS EN ARGENTINA

En Argentina, los casos de leptospirosis se clasifican como sospechosos, sospechosos no conclusivos, probables, descartados y confirmados, siguiendo la definición de casos del Ministerio de Salud de Argentina (Ministerio de Salud Nación, 2014) y el Algoritmo de diagnóstico por laboratorio y notificación (<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/algoritmos>). La leptospirosis está clasificada como Enfermedad de Notificación Obligatoria (ENO) por la Ley 15465, sancionada en el año 1960. Actualmente, los eventos se notifican a través del Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino (SISA).

Se considera **Caso sospechoso** de leptospirosis a cualquier enfermo febril agudo, con cefalea y mialgia, en ausencia de síntomas en vías aéreas superiores, con epidemiología compatible. Puede presentar además ictericia, meningitis, nefropatía, neumonía, hemorragias.

Se consideran antecedentes epidemiológicos compatibles a cualquiera de las siguientes actividades, consideradas como factores de riesgo, realizadas en los 30 días anteriores al inicio de los síntomas:

- actividades en ambientes urbanos y periurbanos vinculadas a recolección de residuos, clasificación de material para reciclaje, limpieza en canales o acequias, trabajo en alcantarillas, tareas de jardinería, albañiles, veterinarios o aquellas actividades que se desarrollen en contacto

con ambientes contaminados con orina de roedores y/o perros u otros animales domésticos y silvestres).

- actividades en ambientes rurales como manejo de animales domésticos (bovinos, cerdos, caballos, u otros), agricultura en áreas anegadas, o realizar actividades recreativas o deportivas que incluyan el contacto con aguas estancadas potencialmente contaminadas con orina de roedores y/o perros u otros animales domésticos o silvestres.
- haber estado en zonas afectadas por inundaciones o catástrofes naturales.

Luego de estudiar un caso sospechoso con técnicas de laboratorio para el diagnóstico específico de leptospirosis, los casos se clasifican de la siguiente manera:

- **Caso Sospechoso – No Conclusivo:** todo caso sospechoso estudiado por laboratorio por cualquier técnica, con resultado negativo en una única muestra de hasta 10 días de evolución desde el inicio de los síntomas.
- **Caso probable:** todo caso sospechoso sumado a:
 - a) un resultado reactivo para las siguientes pruebas de tamizaje: Macroaglutinación (Antígeno TR) y/o ELISA.
 - b) Un resultado reactivo para la prueba de referencia, Microaglutinación (MAT), con título menor a 1/200 en una única muestra.
- **Caso confirmado:** caso sospechoso o probable sumado a:
 - a) En una única muestra: 1. MAT positiva con un título mayor o igual a 1/200; 2. Aislamiento bacteriano; 3. Detección de genoma bacteriano por PCR
 - b) Seroconversión a la MAT, en dos o más muestras, preferentemente con más de 10 días de evolución: primera muestra negativa y segunda positiva; las dos muestras (primera y segunda) positivas con diferencia de al menos 2 títulos entre ellas (directa o inversa).
 - c) Comprobación de la existencia de exposición a la misma fuente y en el mismo periodo que un caso confirmado según los dos puntos anteriores, a) o b).
- **Caso descartado:**
 - a) Dos muestras, con al menos 7 días de separación entre ambas, en las que NO se observe seroconversión directa o inversa a la MAT.
 - b) Resultado NO reactivo para ELISA en muestras de más de 10 días desde el inicio de síntomas.
 - c) MAT negativa en muestra única de más de 10 días de evolución desde el inicio de síntomas.
 - d) Diagnóstico laboratorial confirmatorio para otra enfermedad febril.

La Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL) incluye a laboratorios regionales o provinciales de todo el país y está coordinada por el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospirosis – LNRL del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. E. Coni” -

ANLIS “Dr. C. Malbrán”. Los laboratorios integrantes de la RNLL ejecutan las pruebas de tamizaje disponibles en el país, TR y ELISA-IgM (Vanasco et al., 2012, 2016), en las muestras de pacientes con sospecha de leptospirosis. Las muestras que resultan positivas son derivadas al LNRL para su confirmación mediante MAT y/o PCR en tiempo real para la detección del gen *lipL32* (Stoddard et al., 2009; Vanasco et al., 2016). De la misma manera, pueden enviar muestras de sangre entera o primocultivos para el seguimiento y aislamiento bacteriano. El panel de antígenos utilizado para la MAT en LNRL, incluye 12 de las 19 cepas de referencia de *Leptospira* spp. recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2003), las que fueron evaluadas para su uso en Argentina (Jacob et al., 2015). Este panel incluye 8 cepas de *L. interrogans* (serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Bataviae), 2 cepas de *L. borgpetersenii* (serogrupo Ballum y Tarassovi), 1 cepa de *L. kirschneri* (serogrupo Grippotyphosa) y 1 cepa de *L. biflexa* (serogrupo Semarang). En la Tabla 2 se listan las cepas de *Leptospira* spp. incluidas en el panel de cepas de referencia del LNRL.

Tabla 2. Cepas de referencia de *Leptospira* spp. incluidas en el panel de antígenos de MAT

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1

En nuestro país, la leptospirosis produce casos individuales y brotes durante períodos de lluvias abundantes e inundaciones y afecta predominantemente a hombres adultos de más de 30 años (Cudós et al., 2014; Vanasco et al., 2008). La mayor cantidad de casos ocurren durante los meses lluviosos. Los factores de riesgo que se asocian significativamente a la enfermedad son el trabajo rural, el contacto con aguas superficiales contaminadas y el contacto con inundaciones (Vanasco et al., 2008). Las provincias de Santa Fe y Entre Ríos reportan anualmente el mayor número de casos y muertes de Argentina, constituyendo un problema prioritario de salud pública a nivel regional (Cudós et al., 2014).

Luego del análisis espacial y temporal de leptospirosis en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, López et al. (2019) sugieren que los indicadores hidroclimáticos (precipitación total mensual, nivel hidrométrico mensual de los ríos e Índice de El Niño Oceánico-ONI) varían según las escalas espaciales. A escala provincial, el Índice ONI indicaría mayor incidencia de leptospirosis;

a escala departamental, el Índice ONI y la precipitación mensual indicarían brotes; y a escala local como ciudades ribereñas, los tres indicadores podrían predecir la ocurrencia de brotes. También concluyen que la leptospirosis debe considerarse como un problema regional dadas las características topográficas e hidroclimáticas (condiciones húmedas y cálidas, los eventos de precipitación extrema más frecuentes y las inundaciones más severas).

Según un estudio basado en el análisis de determinantes ambientales y socioeconómicos de la aglomeración urbana de Santa Fe, la propensión a la aparición de leptospirosis humana es mayor en las zonas periurbanas y suburbanas con respecto a las zonas céntricas de las ciudades más grandes (Cristaldi et al., 2022). Por otro lado, Chiani et al. (2023) detectaron diferentes especies de *Leptospira* en el sedimento de los humedales del Bajo Delta del río Paraná, como *Leptospira kmetyi*, *L. mayottensis*, *L. fainei* y *L. meyeri*. Los autores concluyeron que estos ecosistemas, sujetos a actividades productivas como la ganadería, representan una fuente potencial de infección.

Respecto al estudio de reservorios animales, la seropositividad en roedores de la ciudad de Santa Fe es 42% para la especie *M. musculus* (portadora del serogrupo Ballum en áreas urbanas y del serogrupo Icterohaemorrhagiae en los corredores naturales) (Vanasco et al., 2003), y 41.3%, 42.9% y 55% para las especies *Scapteromys aquaticus*, *Akodon azarae* y *Oligoryzomys* spp., respectivamente (Ricardo et al., 2020). Por otro lado, se observa mayor prevalencia de anticuerpos leptospirales en perros (18.2%) que en gatos (3.6%), según una encuesta serológica transversal realizada en mascotas domésticas (perros y gatos) que asistieron a campañas municipales de esterilización y castración en la ciudad de Santa Fe, desde mayo a noviembre del año 2022. Los perros con acceso a la calle tienen mayor probabilidad de ser seropositivos y las áreas con pobreza crónica, riesgo elevado de presentar animales seropositivos (Ricardo et al., 2018).

En cuanto a las variedades de *Leptospira* que circulan en el país, existe evidencia de aislamientos a partir de muestras de humanos, animales y ambientales (Chiani et al., 2016; Chiani et al., 2023; Colombo et al., 2018; Cudós et al., 2014; Loffler et al., 2014; Ricardo et al., 2018; Rossetti et al., 2005; Scialfa et al., 2013; Varni et al., 2018).

Para fortalecer el diagnóstico específico de leptospirosis humana y aislamiento de *Leptospira* spp. en nuestro país, se implementó un sistema de vigilancia intensificada de casos de leptospirosis (Cudós et al., 2014) en Santa Fe y Entre Ríos, desde enero de 2012 a marzo de 2013. Si bien la intervención permitió obtener aislamientos humanos, la recolección de muestras para cultivo sigue siendo infrecuente y, por lo tanto, la tasa de aislamiento de *Leptospira* spp. es baja (menos del 2% de los casos confirmados, resultados no publicados). Es por esto que, la información sobre las especies y los serogrupos que causan infecciones humanas en nuestro país es limitada y se basa, principalmente, en los títulos imprecisos de MAT. La descripción de métodos de genotipificación aplicables en muestras de suero y/o sangre entera crea una oportunidad para aumentar el conocimiento de las variedades de *Leptospira* spp que causan enfermedad en

Argentina, a pesar de las limitaciones del cultivo. Chiani et al. (2016) aplicaron satisfactoriamente dos métodos de genotipificación (ARNr 16S y un esquema MSLT) en aislamientos y muestras clínicas con resultados previos positivos para la amplificación del gen *lipL32*. Sin embargo, resulta relevante optimizar y determinar la utilidad de estos métodos para identificar las especies y serogrupos que causan leptospirosis humana en Argentina, en un número significativo de muestras de suero y sin el tamizaje con pruebas moleculares que sólo identifican especies patógenas.

8 OBJETIVOS DEL TRABAJO

8.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Optimizar la tipificación molecular de *Leptospira* spp. para poder aplicarla directamente sobre muestras clínicas humanas (suero y/o sangre entera).
2. Evaluar la utilidad de la tipificación molecular para conocer la frecuencia relativa de las variedades de *Leptospira* spp. circulantes, en pacientes de Argentina con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016 y su distribución espacial.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar y aplicar el método de tipificación molecular basado en la secuenciación de la región ARNr 16S en muestras de suero y/o sangre entera de pacientes de Argentina, con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016.
2. Aplicar el método de tipificación molecular MLST optimizado para muestras clínicas en muestras de suero y/o sangre entera de pacientes de Argentina, con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016.
3. Evaluar la utilidad específica, ventajas y limitaciones comparando con los otros métodos de tipificación.
4. Calcular la frecuencia relativa de las diferentes variedades de *Leptospira* spp. identificadas por los métodos de tipificación molecular (ARNr 16S, MLST optimizado) en pacientes de Argentina con leptospirosis confirmada (casos incidentes) durante el período 2005-2016.
5. Georreferenciar las variedades de *Leptospira* spp. identificadas a través del tiempo por cada uno de los métodos empleados en forma individual y combinada.
6. Diseñar y optimizar un esquema secuencial de reacciones de PCR en tiempo real para detectar las diferentes especies del género *Leptospira* e identificar y distinguir especies patógenas, de patogenicidad desconocida y saprófitas.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ARN ribosomal 16S

En este estudio se optimizó la reacción de amplificación del gen *rrs* del método ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) descrito por Mérien et al. (1992) y modificado por Varni et al. (2018).

En una primera instancia, se realizó una evaluación de la reacción de amplificación para detectar posibles inhibidores, ensayar distintos tipos de enzimas de amplificación y determinar el límite de detección de la técnica. Luego, se ensayaron diferentes condiciones de reacción para seleccionar la combinación óptima siguiendo el Método Taguchi de optimización de técnicas de biología molecular (Cobb & Clarkson, 1994).

9.1.1 Evaluación de la reacción de amplificación ARNr 16S

9.1.1.1 Detección de inhibidores de la reacción de amplificación

Se seleccionaron dos muestras clínicas con resultados previos positivos para la técnica qPCR LipL32, que confirmaba la existencia ADN de *Leptospira* spp. en la misma, del panel de muestras del Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospirosis (LNRL) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Además, una de las muestras seleccionadas tenía un resultado previo positivo para la técnica ARNr 16S (Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992; Varni et al., 2018), y la otra muestra tenía un resultado previo negativo.

Estas muestras se seleccionaron al azar, del panel preexistente de muestras del LNRL que incluye muestras derivadas por los laboratorios integrantes de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL), para la confirmación de la enfermedad. Las muestras de suero se almacenaron a 70°C hasta su procesamiento.

Para la extracción de ADN de las muestras clínicas, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) según el procedimiento descrito por el fabricante para la extracción y purificación de ADN a partir de 200 µl de muestra de suero (Qiagen, 2007).

Las muestras de ADN obtenidas (M1 y M2) se ensayaron con qPCR LipL32 para confirmar nuevamente la existencia de ADN de *Leptospira* spp.

Las reacciones de amplificación del gen *lipL32* se realizaron con 500 nM de cada primer, 100nM de sonda tipo TaqMan, 1X de IQTM supermix (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y 5 µl de ADN molde, en un volumen final de 25 µl. Las secuencias de los primers y sonda utilizados se describen en la Tabla 3. El ciclado se ejecutó en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y consistió en un ciclo de 2min a 50°C, seguido de un ciclo de 10min a 95°C, luego 45 ciclos de 15seg a 95°C y un ciclo final de 1min a 60°C. En todas las reacciones de amplificación se incluyeron controles positivos (5 µl de ADN de 10⁸ *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV/ml) y de reactivos (sin ADN molde). Se consideró una reacción positiva cuando se observó una curva exponencial

con un valor umbral del número de ciclos (Ct, del inglés: “threshold cycle”) menor a 40.

En paralelo a la detección del gen *lipL32* por qPCR, pero en reacciones independientes, se detectó el gen housekeeping *rnaseP* humano. La amplificación de este gen permite monitorear la eficiencia de la extracción de ácidos nucleicos y controlar la presencia de inhibidores de la PCR. Se utilizaron dos primers (RNaseP3F y RNaseP3R) y una sonda de hidrólisis (RNaseP3) para la detección del producto amplificado. Las reacciones de amplificación del gen *rnaseP* se realizaron con 200 nM de cada primer, 100nM de sonda tipo TaqMan, 1X de IQTM supermix (Bio Rad Laboratories, EEUU) y 5 µl de ADN molde, en un volumen final de 25 µl. Las secuencias de los primers y sonda utilizados se describen en la Tabla 3. El ciclado se ejecutó en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y consistió en un ciclo de 2min a 50°C, seguido de un ciclo de 10min a 95°C, luego 45 ciclos de 15seg a 95°C y un ciclo final de 1min a 60°C. En todas las reacciones de amplificación se incluyeron controles positivos (5 µl de ADN de 10⁸ *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrech IV/ml) y de reactivos (sin ADN molde). Se consideró una reacción positiva cuando se observó una curva exponencial con un valor umbral del número de ciclos (Ct) menor a 40.

Tabla 3: Primers y sondas de hidrólisis utilizados en la qPCR LipL32

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3'	Gen objetivo
LipL32—45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	<i>lipL32</i>
LipL32—286R	GAAGTCCCATTTCAGCGA TT	<i>lipL32</i>
LipL32-189P	FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ1	<i>lipL32</i>
RNaseP3F	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG	<i>rnaseP</i>
RNaseP3R	TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG	<i>rnaseP</i>
RNaseP3	FAM-CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC-BHQ1	<i>rnaseP</i>

F: primer forward, R: primer reverse, P: sonda de hidrólisis; FAM: fluoróforo 6-carboxifluoresceína, BHQ1: black hole quencher 1.

Las muestras M1 y M2 se mezclaron en partes iguales para utilizar la mezcla (M3) como ADN molde en las reacciones de amplificación del ARNr 16S siguientes. Posteriormente, se ejecutaron reacciones de amplificación del gen *rrs* con 1 µM de cada primer, 200µM de dNTP, 1U de polimerasa DreamTaq Green DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), y 5 µl de ADN molde (M1, M2 y M3), en un volumen final de 50 µl. Las secuencias de los primers se describen en la Tabla 4. El ciclado se ejecutó en el termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE. UU.) y consistió en un ciclo inicial de 3 min a 94°C, seguido de un ciclo de 90 seg a 54°C y un ciclo de 2min a 72°C, luego 29 ciclos de 1 min a 94°C, 90seg a 54°C y 2min a 72°C, seguidos de un ciclo final de 10min a 72°C. Se incluyó un control negativo (agua

destilada ultrapura libre de ADNasa y ARNasa).

Tabla 4: Primers utilizados en las reacciones de amplificación del método ARNr 16S

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen objetivo	Producto (pb)	Referencia
A 16s	GGCGGCGCGTCTTAAACATG	<i>rrs</i>	331	(Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992)
B 16s	TTCCCCCATTGAGCAAGATT	<i>rrs</i>	331	(Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992)

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se consideraron positivas a aquellas muestras en las que se observó una banda de 331pb, aproximadamente. Se consideró que la reacción no presentaba inhibidores, si la muestra M3 resultaba positiva. En cambio, se consideró que la reacción presentaba inhibidores, si M3 resultaba negativa.

Para la electroforesis de ADN, los geles se prepararon con agarosa (Bio Rad Laboratories, EEUU), disuelta en una solución 1X de tampón Tris Acetato EDTA (TAE) (UltraPure™ 10X TAE Buffer, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific Inc, EEUU). La composición del Tampón TAE se describió en el punto 9.5.1. Esta solución de agarosa se calentó hasta la disolución completa y se agregó GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EEUU), colorante fluorescente de ácidos nucleicos, en la proporción recomendada por el fabricante (1:10000). La solución se dejó solidificar en la placa para geles de la cuba de electroforesis horizontal, con el peine correspondiente para formar los pocillos de siembra. Luego, las placas con los geles solidificados se sumergieron en la cuba de electroforesis que contenía el tampón TAE 1X (Bio Rad Laboratories, EEUU) y se transfirieron 5µl de muestra y de marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready to use (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a los pocillos de siembra. No fue necesario agregar buffers de carga en las muestras debido a que la polimerasa utilizada en las reacciones de amplificación disponía de un buffer para aportar densidad a los productos. La electroforesis se realizó durante 45min, a 120V y 292A. Las lecturas de los geles se realizaron con transiluminador UV.

9.1.1.2 Evaluación de distintas enzimas de amplificación

Las muestras M1, M2 y M3 se ensayaron mediante reacciones de amplificación ARNr 16S, según lo descrito en el punto anterior, pero con dos enzimas de amplificación diferentes. Se utilizó la enzima DreamTaq Green DNA polymerase (Thermo Scientific, USA) y la mezcla de reacción IQ™ supermix (Bio Rad Laboratories, California, EEUU), en reacciones independientes.

Se evaluó si los resultados obtenidos anteriormente se modificaban al utilizar distintas enzimas

de amplificación.

9.1.1.3 Evaluación del límite de detección

Para la determinación del límite de detección del ARNr 16S, se elaboró una curva de calibrado realizando diluciones seriadas de una cepa de referencia seleccionada del panel del INER en un pool de muestras de suero.

Para esto, se seleccionaron muestras de suero (n=26) de pacientes con leptospirosis descartada del panel de muestras preexistentes del LNRL descrito en el punto 9.1.1.1. Se seleccionaron al azar muestras límpidas, no lipémicas y no ictericas. Se realizó un pool de muestras de suero en un tubo estéril que, previa homogeneización, se fraccionó en alícuotas en tubos estériles de 2ml, aptos para biología molecular. Las alícuotas de suero control negativo se almacenaron en freezer a -70°C hasta su utilización.

El pool de muestras de suero se utilizó para la elaboración de una curva de calibrado, con la que se determinó el límite de detección de la reacción de amplificación del ARNr 16S en el punto 9.1.4.

Por otro lado, se seleccionó un cultivo de la cepa de referencia *Leptospira interrogans* Serogrupo Canicola Serovar Canicola Cepa Hond Utrecht IV del panel de cepas de referencia del LNRL y se determinó su concentración mediante recuento bacteriano en cámara de Neubauer. Se realizó una dilución inicial 1/100 de la cepa con medio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris líquido) estéril y se procedió al recuento con microscopio de campo oscuro y objetivo 20X, por duplicado y con operarios diferentes. La composición y elaboración del medio de cultivo EMJH se describió en el punto 9.5.2.

Una vez determinada la concentración bacteriana, se realizaron diluciones seriadas al décimo, de la cepa de referencia en el pool de muestras de suero, partiendo de una concentración de 10^8 *Leptospira* sp./ml hasta 10^0 *Leptospira* sp./ml. Las diluciones se realizaron por triplicado, en tubos estériles aptos para biología molecular. Luego, se realizaron extracciones de ADN de cada dilución de cepa con el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante y descrito en el punto 9.1.1.1.

El recuento bacteriano, las diluciones seriadas y las extracciones de ADN de cada dilución, se realizaron en el transcurso de 6 horas para evitar el sobrecrecimiento bacteriano y la modificación de la concentración inicial.

La calidad de la curva de calibrado se evaluó de manera indirecta mediante la determinación de la eficiencia de la técnica qPCR LipL32, técnica validada con anterioridad (Vanasco et al., 2016). Las muestras de ADN se ensayaron mediante qPCR LipL32 según lo descrito en el punto 9.1.1.1 y se graficaron los valores de Ct (del inglés, *threshold Cycle*) obtenidos versus las concentraciones de ADN, para obtener la ecuación de la recta. El valor de eficiencia de la reacción se calculó con las siguientes ecuaciones y el valor de la pendiente de la recta:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}, \% \text{ EFICIENCIA} = (E-1) \times 100\%$$

Considerando que la eficiencia de la amplificación es el porcentaje de templado que fue amplificado en cada ciclo, una eficiencia cercana a 100% sería el mejor indicador de la robustez y reproducibilidad del ensayo. Según esto, la eficiencia de la amplificación debería encontrarse entre 90-105% (Bio-Rad Laboratories, 2006).

Luego de la elaboración de la curva de calibrado, se determinó el límite de detección de la reacción de amplificación del gen *rrs*. Cada muestra de ADN de la curva de calibrado se ensayó con el protocolo original de amplificación ARNr 16S (punto 9.1.1.1). Luego de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación, se consideró como límite de detección a la concentración más baja de la cepa Hond Utrecht IV de *L. interrogans* que produjo un amplificado visible en el gel de agarosa.

9.1.2 Determinación de las condiciones óptimas de reacción

Con el propósito de optimizar la reacción de amplificación del gen *rrs* que codifica para el ARNr 16S (Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992; Varni et al., 2018), se ensayaron distintas variables para encontrar la combinación óptima.

La optimización de esta PCR de punto final se basó en el Método Taguchi (Cobb & Clarkson, 1994), ampliamente utilizado durante el diseño de procesos industriales y adaptado para las técnicas moleculares para establecer las condiciones óptimas, utilizando el menor número posible de experimentos. El número de experimentos necesarios (E) se calculó a partir de la ecuación:

$$E = 2k + 1^{(1)} \rightarrow k: \text{número de variables a probar.}$$

Para cumplir con este objetivo, se evaluaron tres niveles (A, B y C) de cuatro variables que se combinaron en reacciones independientes en una matriz ortogonal (Tabla 5). Según lo calculado con la ecuación ⁽¹⁾ descripta previamente, se requirieron 9 experimentos para ensayar concentraciones diferentes de dNTPs (de 50 a 200 µM) y de cada primer (1 a 1.5 µM), y distintas temperaturas de annealing (54 a 63°C). Cada columna de la matriz representaba una variable con los tres niveles y cada fila representaba una reacción individual o experimento.

Tabla 5: Matriz ortogonal, combinación de tres niveles (A, B y C) de las cuatro variables estudiadas

Experimento n°:	Variables			
	dNTP (μM)	primer A (μM)	primer B (μM)	Annealing (°C)
1	A: 200	A: 1	A: 1	A: 54
2	A: 200	B: 0.5	B: 0.5	B: 59
3	A: 200	C: 1.5	C: 1.5	C: 63
4	B: 100	A: 1	B: 0.5	C: 63
5	B: 100	B: 0.5	C: 1.5	A: 54
6	B: 100	C: 1.5	A: 1	B: 59
7	C: 50	A: 1	C: 1.5	B: 59
8	C: 50	B: 0.5	A: 1	C: 63
9	C: 50	C: 1.5	B: 0.5	A: 54

Los experimentos se realizaron según el protocolo descripto en el punto 9.1.1.1, usando muestras de ADN de la curva de calibrado como molde de la reacción de amplificación y modificando las variables según el número de experimento.

Se realizaron 18 experimentos en total, utilizando dos muestras distintas de ADN molde. En 9 experimentos se ensayó el ADN correspondiente a la concentración inmediatamente superior al límite de detección, y en los otros 9, el correspondiente a la concentración inmediatamente inferior. Luego de la electroforesis en gel de agarosa, se evaluaron los productos obtenidos con las distintas combinaciones de variables. Se consideró óptima, a la combinación de variables que generó un producto de amplificación a partir del ADN correspondiente a la concentración inmediatamente inferior al límite de detección.

9.2 APLICACIÓN DEL ARNr 16S Y MLST OPTIMIZADOS EN MUESTRAS DE SUERO PARA IDENTIFICACIÓN, ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS VARIEDADES DE *Leptospira* spp.

Mediante un diseño observacional retrospectivo, se identificó *Leptospira* spp. en muestras de suero de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina, con el método ARN ribosomal 16S optimizado en este estudio y un esquema *Multilocus Sequence Typing* (MLST) optimizados por Weiss et al. (2016). Para ello, se extrajo ADN de muestras de suero de fase septicémica de pacientes seleccionados, y se amplificaron los genes *rrs* y los siete genes del esquema MLST mediante reacciones PCR de punto final. Ambos métodos de genotipificación se aplicaron en paralelo, a ciegas y sin emplear ningún otro método molecular de tamizaje. Luego de la secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, se identificaron las especies y serogrupos del género *Leptospira* causantes de la enfermedad. Se calculó la frecuencia relativa de las variedades identificadas y se procedió a la localización geográfica de las mismas.

9.2.1 Muestras de suero

Para la determinación del tamaño de muestra, se consideró una población de 472 muestras de suero de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina según la definición de caso del Ministerio de Salud Nación (2014), de fase septicémica (hasta 7 días desde el inicio de los síntomas), incorporadas al panel de muestras del LNRL descripto en el punto 9.1.1.1.

-Definición de caso confirmado de leptospirosis (Ministerio de Salud Nación, 2014): paciente con enfermedad febril aguda, síntomas y epidemiología compatibles con leptospirosis más: a) un título de $\text{MAT} \geq 1/200$ y/o aislamiento bacteriano y/o detección de genoma bacteriano, o b) seroconversión en la MAT, en dos o más muestras (Ministerio de Salud Nación, 2014). Síntomas compatibles con leptospirosis: fiebre, cefalea y mialgia. También, ictericia, meningitis, nefropatía, neumonía, hemorragias, en ausencia de síntomas en vías aéreas superiores. Antecedentes epidemiológicos compatibles: actividades realizadas hasta 30 días antes del inicio de los síntomas como actividades en ambientes urbanos vinculadas a recolección de residuos; clasificación de material para reciclaje, limpieza de canales o acequias o trabajo en alcantarillas; actividades en ambientes rurales como manejo de animales, agricultura en áreas anegadas, pesca, o cualquier otra actividad, laboral o recreativa en ambientes acuáticos naturales; y haber estado en zonas afectadas por inundaciones.

El 82.20% (n=388) de las muestras de la población provenían de pacientes con leptospirosis confirmada por MAT; 11.02% (n=52) por LipL32qPCR; 5.08% (n=24) por MAT más LipL32qPCR; 0.85% (n=4) por aislamiento de *Leptospira* sp. más LipL32qPCR; 0.42% (n=2) por aislamiento de *Leptospira* sp.; 0.21% (n=1) por MAT más aislamiento de *Leptospira* sp. y 0.21% (n=1) por MAT más LipL32qPCR más aislamiento de *Leptospira* sp.. Respecto a la distribución temporal de la población, 3.39% (n=16) de las muestras fueron recolectadas en el año 2005; 0.64% (n=3) en 2006; 17.80% (n= 84) en 2007; 3.39% (n= 16) en 2008; 4.03% (n= 19) en 2009; 19.49% (n= 92) en 2010; 7.63% (n= 36) en 2011; 4.24% (n= 20) en 2012; 7.84% (n= 37) en 2013; 11.86% (n= 56) en 2014; 10.38% (n= 49) en 2015 y 9.32% (n= 44) en 2016. Respecto a la distribución espacial de las muestras, 56.14% (n= 265) provenían de pacientes de Entre Ríos; 23.31% (n= 110) de Santa Fe; 3.60% (n= 17) Chaco; 3.18% (n= 15) de Misiones; 2.54% (n= 12) de Salta; 2.33% (n= 11) de Río Negro; 1.69% (n= 8) de Buenos Aires; 1.69% (n= 8) de Córdoba; 1.48% de Corrientes (n= 7); 0.85% (n= 4) de Formosa; 0.85% (n= 4) de La Pampa; 0.64% (n= 3) de Jujuy; 0.64% (n= 3) de Neuquén; 0.42% (n= 2) de Catamarca; 0.21% (n= 1) de Tucumán y en el 0.42% (n= 2) de las muestras se desconocía su procedencia.

El tamaño de muestra requerido para la determinación de la frecuencia de las variedades de *Leptospira* spp. se obtuvo con Epidat (2016), considerando un 5% de precisión, 95% de confianza

y 50% de prevalencia. Se seleccionaron aleatoriamente 228 muestras de suero del banco de muestras, teniendo en cuenta los siguientes criterios de:

-Inclusión:

- Muestras de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina, desde el 1 de enero de 2005 hasta el 31 de diciembre de 2016.
- Muestras de suero extraídas desde el inicio síntomas y hasta el séptimo día de evolución de los mismos (fase septicémica de la enfermedad).

-Exclusión:

- Volumen mínimo requerido de muestra: 200µl.

Las muestras suero de fase septicémica seleccionadas para el estudio (mediana: 4.6 días de evolución; valor máximo: 5.0 días y valor mínimo: 0 días) provenían de pacientes con leptospirosis confirmada mediante los siguientes métodos diagnósticos: 79.8% (n=182) por MAT; 12.3% (n=28) por LipL32qPCR; 6.6% (n=15) por MAT más LipL32qPCR; 0.9% (n=2) por LipL32qPCR más aislamiento de *Leptospira interrogans* y 0.4% (n=1) por MAT más LipL32qPCR más aislamiento de *L. interrogans*. Respecto a la distribución temporal, 0.88% (n=2) en 2005; 0.88% (n=2) en 2006; 19.30% (n=44) en 2007; 3.95% (n= 9) en 2008; 3.07% (n=7) en 2009; 17.98% (n=41) en 2010; 7.46% (n=17) en 2011; 4.82% (n=11) en 2012; 6.58% (n=15) en 2013; 7.89% (n=18) en 2014; 15.79% (n=36) en 2015 y 11.40% (n=26) en 2016. Según los domicilios declarados en las correspondientes fichas epidemiológicas o los registrados en SISA, 47.37% (n=108) de las muestras provenían de pacientes de Entre Ríos; 30.26% (n=69) de Santa Fe; 4.39% (n=10) de Río Negro; 3.95% (n=9) de Chaco; 2.63% (n=6) de Misiones; 2.63% (n=6) de Salta; 2.19% (n=5) de Buenos Aires; 2.19% (n=5) de Córdoba; 1.32% (n=3) de Corrientes; 0.88% (n=2) de Formosa; 0.88% (n=2) de Neuquén; 0.44% (n=1) de Jujuy; 0.44% (n=1) de La Pampa y 0.44% (n=1) de Tucumán.

9.2.1.1 Extracción de ADN genómico a partir de muestras de suero

Se extrajo ADN a partir de las 228 muestras de suero de fase septicémica seleccionadas con el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) descripto en el punto 9.1.1.1.

9.2.2 Aplicación de los métodos ARNr 16S y MLST optimizados en muestras de suero

Se aplicaron dos métodos de tipificación molecular optimizados, el ARNr 16S y MLST, en las muestras de ADN (n=228) extraídas según el punto 9.2.1.1. Los métodos se aplicaron en paralelo, a ciegas y sin emplear ningún otro método molecular de tamizaje.

Para la determinación de las especies de *Leptospira* spp., se aplicó el método ARNr 16S basado

en la amplificación por reacciones PCR de punto final y secuenciación del gen *rrs* con el set de primers descrito por Mérien et al. (1992), el ciclado descrito por Varni et al., (2018) y las concentraciones de primers, dNTPs y temperatura de annealing óptimas determinadas en este estudio (punto 9.1.3).

Para la determinación de los serogrupos probables se aplicó el método *Multilocus sequence typing* (MLST) descrito (Boonsilp et al., 2013b) y optimizado por Weiss et al. (2016) para su aplicación directa en muestras clínicas, basado en la amplificación por reacciones PCR de punto final anidadas y secuenciación de siete genes constitutivos (*caiB*, *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA*). En este estudio se amplificó el gen *glmU* como primer paso y luego, en las muestras que resultaron positivas, se amplificaron los otros seis genes. Este protocolo de trabajo se estableció para lograr una asignación segura de serogrupos con perfiles MLST completos, considerando los genes amplificados con mayor frecuencia, *caiB* seguido de *glmU* (Weiss et al., 2016) y por otro lado, *glmU* y *pntA* (Philip et al., 2020).

Luego de la amplificación de los genes de ambos métodos, los productos amplificados se analizaron con electroforesis en geles de agarosa, se purificaron y se enviaron a secuenciar. Luego del análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se identificaron las variedades de *Leptospira* spp. que causaron enfermedad.

9.2.2.1 Amplificación del gen *rrs* (ARNr 16S)

El gen *rrs* se amplificó en las 228 muestras de ADN obtenidas en el punto 9.2.1.1, según lo descrito por Mérien et al. (1992), Varni et al., (2018), mediante reacciones PCR de punto final y utilizando la combinación de variables óptimas determinadas en este estudio.

Las reacciones de amplificación del gen *rrs* se realizaron con 1U de polimerasa DreamTaq Green DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) y 5 µl de ADN molde, en un volumen final de 50µl. Se utilizaron las concentraciones óptimas de primers y dNTP determinadas en el punto 9.1.2. Los primers utilizados se describieron en la Tabla 4. El ciclado se ejecutó en el termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE. UU.) y consistió en un paso inicial de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguido de un ciclo de annealing durante 90 seg a 54°C y un paso de extensión de 2min a 72°C, luego 29 ciclos de 1 min a 94°C, 90seg a Ta (°C) y 2min a 72°C, seguidos de un ciclo final de extensión de 10min a 72°C. Ta corresponde a la temperatura de annealing óptima determinada en el punto 9.1.2. Se incluyó un control positivo (5 µl de ADN de 10⁸ *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV/ml), uno negativo (agua destilada ultrapura libre de ADNasa y ARNasa) y un control de reactivos (ausencia de ADN molde).

9.2.2.2 Amplificación de los siete genes del esquema MLST optimizado

En primer lugar, se amplificó el gen *glmU* en las 228 muestras de ADN obtenidas en el punto

9.2.1.1. Sólo se ejecutaron las amplificaciones de los demás genes (*pntA*, *sucA*, *pfkB*, *mreA*, *caiB* y *tpiA*) en aquellas muestras que, luego de la amplificación del gen *glmU*, generaron bandas electroforéticas del tamaño esperado.

Los genes se amplificaron mediante reacciones de PCR punto final anidadas. La primera y segunda ronda de amplificaciones de los genes *glmU*, *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *mreA* y *caiB* se realizaron con 1 μ M de cada primer, 200 μ M de dNTP, 1.25U de polimerasa DreamTaq Green DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), 2mM de Cl_2Mg (disponibles en el buffer provisto con la polimerasa) y 5 μ l de ADN molde, en un volumen final de 25 μ l y 50 μ l, respectivamente. En la primera amplificación se utilizó el set de primers descrito por Boonsilp y col. (2013) y el ADN extraído en el punto 9.2.1.1. En la segunda ronda se utilizó el set de primers descrito por Weiss y col. (2016) y el producto amplificado en la primera reacción como ADN molde. En el caso de la amplificación del gen *tpiA*, las dos reacciones de amplificación se realizaron con 3.5mM de Cl_2Mg . Los primers utilizados se describen en la Tabla 6.

Los ciclados se ejecutaron en el termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE. UU.). El ciclado de la primera ronda de amplificación (Boonsilp et al., 2013b) consistió en un ciclo de 2min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 10s a 95°C, 15s a 46°C y 30s a 72°C, y un ciclo final de extensión de 7min a 72°C. Las condiciones del ciclado de la segunda ronda de amplificación (Weiss et al., 2016) fueron las siguientes: un ciclo de 10 min a 95 °C, seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 46 °C y 30 segundos a 72 °C. Luego, 10 ciclos con una temperatura de annealing con aumento de 1 °C por ciclo, seguidos de 20 ciclos con una temperatura de annealing de 56 °C, seguidos de un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C. Se incluyó un control positivo (5 μ l de ADN de 10^8 *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV/ml), uno negativo (agua destilada ultrapura libre de ADNasa y ARNasa) y un control de reactivos (ausencia de ADN molde).

Tabla 6: Primers utilizados en las reacciones de amplificación del método MLST

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen objetivo	Producto (pb)	Referencia
glmU-F _M	AGGATAAGGTCGCTGTGGTA	<i>glmU</i>	650	(Boonsilp et al., 2013b)
glmU-R _M	AGTTTTTTTCCGGAGTTTCT	<i>glmU</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
pntA-F _M	TAGGAAARATGAAACCRGGAAC	<i>pntA</i>	621	(Boonsilp et al., 2013b)
pntA-R _M	AAGAAGCAAGATCCACAAYTAC	<i>pntA</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
sucA-F _M	TCATTCCACTTYTAGATACGAT	<i>sucA</i>	640	(Boonsilp et al., 2013b)
sucA-R _M	TCTTTTTTGAATTTTTGACG	<i>sucA</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
tpiA-F _M	TTGCAGGAAACTGGAAAATGAAT	<i>tpiA</i>	639	(Boonsilp et al., 2013b)
tpiA-R _M	GTTTTACRGAACCHCCGTAGAGAAT	<i>tpiA</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
pfkB-F _M	CGGAGAGTTTTATAARAAGGACAT	<i>pfkB</i>	588	(Boonsilp et al., 2013b)
pfkB-R _M	AGAACACCCGCCGCAAAACAAT	<i>pfkB</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
mreA-F _M	GGCTCGCTCTYGACGGAAA	<i>mreA</i>	719	(Boonsilp et al., 2013b)
mreA-R _M	TCCRTAACTCATAAAMGACAAAGG	<i>mreA</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
caiB-F	CAACTTGCGGAYATAGGAGGAG	<i>caiB</i>	650	(Boonsilp et al., 2013b)
caiB-R	ATTATGTTCCCCGTGAYTCG	<i>caiB</i>		(Boonsilp et al., 2013b)
1-glmU-2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTCGYATGA AAACGGATCAG	<i>glmU</i>	598	(Weiss et al., 2016)
1-glmU-2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCGGAAGR TARTATTCDDCCCTG	<i>glmU</i>		(Weiss et al., 2016)
2-pntA-2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTATTTATY TVGGRATGTTYCA	<i>pntA</i>	607	(Weiss et al., 2016)
2-pntA-2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCGATTTC TRTTATCYACRAT	<i>pntA</i>		(Weiss et al., 2016)

3-sucA- 2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTGCSGGTR ATCATCWBATGG	<i>sucA</i>	552	(Weiss et al., 2016)
3-sucA- 2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCGRAAWC CYTTYGCAAGATC	<i>sucA</i>		(Weiss et al., 2016)
4-tpiA- 2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTATTTTCYT TACGAAT RAAAGARTG	<i>tpiA</i>	555	(Weiss et al., 2016)
4-tpiA- 2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCCMCATTC GATYMRAGAAAA	<i>tpiA</i>		(Weiss et al., 2016)
5-pfkB- 2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTGTYGTAT CGATCGSYTTC	<i>pfkB</i>	540	(Weiss et al., 2016)
5-pfkB- 2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCYCCSGA AGAYAASGGWCAT	<i>pfkB</i>		(Weiss et al., 2016)
6-mreA- 2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTCRRGAAG YRGTGGATCAGG	<i>mreA</i>	568	(Weiss et al., 2016)
6-mreA- 2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCCCKATCCT TACTYTCRTARCT	<i>mreA</i>		(Weiss et al., 2016)
7-caiB- 2F_M13	TGTAACGACGGCCAGTCTTKCTT CRATYTTGGCG	<i>caiB</i>	589	(Weiss et al., 2016)
7-caiB- 2R_M13	CAGGAAACAGCTATGACCAMCGAT ATGTWAY MGGRGTT	<i>caiB</i>		(Weiss et al., 2016)

F: primer forward, R: primer reverse, Código de bases degeneradas: R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, N=A/C/G/T

9.2.2.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa de los productos amplificados

Los productos obtenidos luego de la amplificación del gen *rrs* y de la segunda ronda de amplificación de los genes del MLST, se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% según lo descrito en el punto 9.1.1.1.

Se consideraron positivas, aquellas muestras en las que se observó una banda electroforética de 331, 598, 607, 552, 555, 540, 568 y 589pb los genes *rrs*, *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* y *caiB*, respectivamente.

9.2.2.4 Purificación de los productos de amplificación

Los productos obtenidos con la amplificación de los genes *rrs*, *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* y *caiB*, que generaron una banda electroforética del tamaño esperado, se purificaron con el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). De esta manera, el ADN purificado pudo utilizarse para la secuenciación posterior de los productos obtenidos.

9.2.2.5 Secuenciación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación purificados obtenidos con los métodos ARNr 16S y MLST, se

enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur) mediante el método Sanger. En el caso del MLST, sólo se enviaron a secuenciar aquellas muestras en las que se amplificaron los 7 genes, es decir, que resultaron con esquema MLST completo.

9.2.2.6 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas para los genes *rrs* y *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* y *caiB*, se editaron con CHROMAS LITE 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., Australia) y se ensamblaron con el software STADEN Package (MRC-LMB, Reino Unido).

Las secuencias del gen *rrs* (ARNr 16S) se compararon con la base de datos “*The Ribosomal Database Project (RDP)*” y se obtuvo la especie del género *Leptospira* y la puntuación correspondiente, el *S_{ab} score*: número de oligómeros únicos de 7 bases compartidos entre una secuencia y una secuencia RDP dada, dividido por el menor número de oligos únicos. (Wang et al., 2007). A cada muestra, se le asignó la especie que obtuvo la mayor puntuación *S_{ab} score*. Las secuencias de los genes *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* y *caiB* se alinearon con MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) y se analizaron con la base de datos “*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST)*” para asignar la secuencia tipo (ST, del inglés: *Sequence Type*) (Jolley et al., 2018) e identificar los serogrupos probables que causaron la enfermedad. Se asignaron los STs en las muestras que resultaron con un esquema MLST completo, a partir de las secuencias de los 7 loci.

9.2.3 Determinación de la frecuencia relativa de las especies y serogrupos del género *Leptospira*

Se determinó la frecuencia relativa de cada especie de *Leptospira* identificada con el método ARNr 16S y la de cada serogrupo probable identificado por el método MLST, en las muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina, durante el período 2005-2016 y por cada año estudiado.

La frecuencia relativa se calculó como el porcentaje de la especie X o serogrupo X, respecto del total de especies/serogrupos identificados. En el caso de los serogrupos, para el cálculo se consideraron aquellas muestras con amplificación de los 7 genes del esquema MLST y que resultaron con un ST que permitió la definición del serogrupo probable.

9.2.4 Georreferenciación de las especies y serogrupos del género *Leptospira*

Se utilizó el Sistema de Información Geográfica QGIS 3.40.3 para georreferenciar los casos tipificados exitosamente y las variedades de *Leptospira* spp. identificadas en las muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina, durante el período 2005-2016.

Se consideraron los domicilios declarados en las fichas epidemiológicas o en el “Sistema

Integrado de Información Sanitaria Argentina – SISA” (<https://sis.ms.gov.ar/sisa/>), de los pacientes en cuyas muestras de suero se identificó la especie o serogrupo bacteriano que causó la enfermedad. Se obtuvieron las coordenadas XY de cada domicilio con Google Maps. Se utilizaron mapas digitalizados de la República Argentina, a escala 1:250000, referenciados en coordenadas geográficas utilizando el Sistema de Referencia WGS84 del Instituto Geográfico Nacional (disponibles en <http://www.ign.gob.ar/sig>). Con estas coordenadas se crearon mapas de distribución geográfica de las especies y STs identificadas en las muestras de suero de pacientes de Argentina, con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016. Se generaron mapas de calor con la herramienta “Estimación de densidad de núcleos” para identificar patrones de distribución.

9.3 EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN ARNr ribosomal 16S y MLST

La utilidad de los métodos ARNr 16S y MLST se evaluó mediante la a) determinación de la tasa de éxito de tipificación de cada método; b) determinación de la concordancia de los resultados de ambos métodos c) comparación de los serogrupos identificados en muestras de suero de fase septicémica mediante los métodos moleculares, con los inferidos en muestras de fase inmune mediante MAT; c) comparación de las variedades de *Leptospira* spp identificadas en dos tipos distintos de muestras de un mismo paciente, ambas extraídas en la fase septicémica de la enfermedad y d) evaluación final de ventajas y desventajas de ambos métodos.

9.3.1 Tasa de éxito de tipificación

Para evaluar la utilidad de los métodos de genotipificación empleados, se decidió utilizar un indicador denominado “Tasa de éxito de tipificación (TT)”. Se calculó la TT como el porcentaje de muestras clínicas con *Leptospira* spp. identificada (muestras tipificadas), respecto del total de muestras de suero de fase septicémica de los pacientes incluidos en el estudio (n=228). Para el cálculo de la TT, los métodos de tipificación se aplicaron en todas las muestras seleccionadas, en paralelo, a ciegas y sin utilizar otro método molecular de tamizaje. En el caso del ARNr 16S, en el numerador se incluyeron las muestras en las que se identificó la especie del género *Leptospira*. Para el cálculo de la TT del MLST, en el numerador se incluyeron las muestras en las que se logró la amplificación de los 7 genes del esquema y la asignación de la Secuencia Tipo (ST). La tasa se calculó para todo el período de estudio, 2005 a 2016, y por año estudiado.

9.3.2 Evaluación de la concordancia entre los métodos ARNr 16S y MLST

Para estimar el grado de acuerdo de los resultados obtenidos con los dos métodos de tipificación, ARNr 16S y MLST, se determinó el coeficiente kappa de Cohen mediante Epidat (2016). Para el cálculo del coeficiente se consideraron resultados positivos y negativos según éxito de

tipificación.

9.3.3 Comparación de los serogrupos identificados por MLST en las muestras de suero de fase septicémica, con los inferidos por MAT en las muestras de suero de fase inmune

De los 228 pacientes con leptospirosis confirmada que disponían de muestras de suero de fase septicémica, cuya selección se describió en el punto 9.2.1, 159 también disponían de muestras de suero de la fase inmune de la enfermedad (luego de 7 días desde el inicio de los síntomas). Estas muestras se analizaron los títulos de MAT para determinar los serogrupos presumiblemente infectantes. Se definió como serogrupo presumiblemente infectante, al serogrupo del panel de antígenos que reaccionó con el máximo título en la MAT cuantitativa (Levett, 2003a). El serogrupo se consideró “indefinido” en los casos confirmados por seroconversión de la MAT, y cuando dos o más serogrupos diferentes mostraban el título máximo. Se calculó la proporción relativa de los serogrupos inferidos por MAT como el porcentaje del serogrupo X, respecto del total de serogrupos identificados.

Luego de esto, se compararon las proporciones relativas de los serogrupos de *Leptospira* spp. identificados por MLST (método molecular) en muestras de fase septicémica (serogrupos probables) calculadas según el punto 9.2.3, con las proporciones de los serogrupos inferidos por MAT (método serológico) en muestras de fase inmune (serogrupos presumiblemente infectantes).

9.3.4 Comparación de las variedades de *Leptospira* spp. identificadas en cultivos y muestras clínicas de fase septicémica

En 8 pacientes con leptospirosis confirmada por cultivo, se compararon los resultados de tipificación obtenidos en las muestras clínicas de fase septicémica y en los aislamientos. En estos pacientes, se compararon las especies y serogrupos identificados en las muestras de suero mediante ARNr 16S y MLST, con las especies y serogrupos identificados en los aislamientos mediante los métodos de genotipificación y el método fenotípico (MAT).

9.3.5 Evaluación de ventajas y limitaciones del ARNr 16S y el esquema MLST

Las ventajas y limitaciones de los métodos ARNr 16S y MLST se determinaron en función de la rapidez, costo, nivel de resolución taxonómica y tasa de tipificación. Con estos datos se elaboró una tabla de evaluación cruzada.

9.4 DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESQUEMA SECUENCIAL DE REACCIONES PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DISTINTOS GRUPOS DE ESPECIES DE *Leptospira*

En este se diseñó un esquema secuencial de 4 reacciones PCR en tiempo real, para identificar a las bacterias del género *Leptospira*, los distintos grupos de especies según su patogenicidad (patógenas y de patogenicidad intermedia) y la especie patógena más frecuente en Argentina. La identificación de la especie más frecuente fue uno de los resultados de esta tesis.

El diseño se basó en la amplificación de distintas regiones del gen *rrs* mediante qPCR. Para esto diseñaron sets de primers y sondas de hidrólisis tipo TaqMan específicas. Como segundo paso, se determinó la temperatura de annealing óptima para cada reacción. Para esto, se ejecutaron reacciones qPCR con gradientes de temperatura y se ensayaron muestras de ADN de cepas de referencia y aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp., representativas de cada grupo de especies, y cepas tipo ATCC de otros géneros bacterianos. Luego, siguiendo el Método Taguchi (Cobb & Clarkson, 1994; Morero et al., 2021) para la optimización de técnicas moleculares, se procedió a ensayar reacciones qPCR con diferentes combinaciones de factores de reacción, para identificar la combinación óptima que mejoraba el desempeño de cada qPCR.

9.4.1 Microorganismos

9.4.1.1 Cepas de referencia de *Leptospira* spp.

Se utilizaron 4 cepas de *Leptospira* spp. del panel de cepas de referencia del LNRL, como controles positivos de las reacciones qPCR. Se seleccionaron 4 cepas representantes de especies patógenas y 1 cepa representante de especies saprófitas. En la Tabla 7 se listan las cepas empleadas.

Las cepas del panel de referencia se mantuvieron viables mediante repiques en medio EMJH líquido nuevo, con una frecuencia de 10 días. La composición y elaboración del medio EMJH se describió en el punto 9.5.2. Los repiques nuevos se incubaron a 28°C. Luego de 4 o 5 días de incubación, las cepas se observaron nuevamente con microscopio de campo oscuro y objetivo de 20X para verificar el desarrollo de las mismas y la ausencia de contaminación.

9.4.1.2 Aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp.

Debido a que el panel de cepas de referencia no incluye cepas de especies de patogenicidad desconocida, se seleccionaron 2 aislamientos autóctonos previamente caracterizados del panel de aislamientos del LNRL. Estos aislamientos se utilizaron como controles positivos representantes de especies de patogenicidad desconocida en las reacciones qPCR. Los aislamientos empleados se listan en la Tabla 7.

Tabla 7: Cepas de *Leptospira* spp. utilizadas en las técnicas de biología molecular

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. borgpetersenii</i> ^R	Ballum	Castellonis	Castellón 3
<i>L. interrogans</i> ^R	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i> ^R	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i> ^R	Panama	Panama	CZ214K
<i>L. biflexa</i> ^R	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. wolffii</i> ^A	--	--	--
<i>L. broomii</i> ^A	--	--	--

^R cepas de referencia; ^A aislamientos autóctonos; Pat: cepa patógena, Sap: cepa saprófita, Int: cepa de patogenidad desconocida.

Los aislamientos de *Leptospira* spp. con un buen crecimiento bacteriano, se mantuvieron viables en EMJH semisólido a temperatura ambiente. Cada tres meses se transfirieron a medios de cultivo nuevos, se incubaron a 28°C hasta obtener desarrollo bacteriano y se observaron en microscopio de campo oscuro con objetivo de 20X. Unas semanas antes de proceder a la extracción del ADN, los aislamientos seleccionados se inocularon en medio EMJH líquido para facilitar el proceso, se incubaron a 28°C hasta obtener desarrollo bacteriano y se observaron en microscopio de campo oscuro con objetivo de 20X.

Los aislamientos autóctonos fueron tipificados previamente mediante el métodos serológico con anticuerpos hiperinmunes de conejo y los métodos moleculares ARN 16S (Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992; Varni et al., 2018) y MLST (Boonsilp et al., 2013b).

9.4.1.3 Cepas de la colección americana de cultivos tipo ATCC

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas de control tipo ATCC (del inglés: *American Type Culture Collection*) para la evaluación del método molecular diseñado: *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) ATCC 27853, *Escherichia coli* (Eco) ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* (Sau) ATCC 25923. Las cepas ATCC fueron aportadas por la Sección Bacteriología del Laboratorio Central del Hospital J. B. Iturraspe de Santa Fe, Argentina.

Las cepas ATCC se mantuvieron viables mediante repiques sucesivos en medio Agar CLDE (del inglés: *Cysteine lactose electrolyte deficient*) y se incubaron a 37°C hasta obtener el crecimiento adecuado. La composición del medio de cultivo CLDE se describió en el punto 9.5.3.

9.4.2 Extracción de ADN genómico a partir de cepas de *Leptospira* spp. y cepas ATCC

Se utilizó el kit comercial Highway ADN PuriPrep-B kit (INBIO HIGHWAY Biología Molecular, Buenos Aires, Argentina) para la extracción de ADN genómico a partir de los cultivos de *Leptospira* spp. y de cepas ATCC, descriptos en la Tabla 7 y en el punto 9.4.1.3. Mediante este kit se extraje ADN puro libre de proteínas, luego de la lisis bacteriana con proteinasa K, adsorción en una minicolumna de sílica y dos pasos de lavado, sin requerir del uso de solventes orgánicos ni fenol. Se procedió según el procedimiento sugerido por el fabricante para la extracción y purificación de ADN a partir de bacterias Gram positivas y Gram negativas (INBIO HIGHWAY

Biología Molecular, 2024).

9.4.2.1 Cuantificación de ADN

La cantidad de ADN extraído se determinó con el fluorómetro Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las muestras de ADN se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.4.3 Diseño de los sets de primers y sondas

De la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos GenBank® disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ (Benson et al., 2013), se descargaron secuencias del gen *rrs* correspondientes a especies patógenas del género *Leptospira* (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santorasai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi* y *L. mayottensis*), a especies saprófitas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* y *L. yanagawae*) y a especies de patogenicidad desconocida (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* y *L. licerasiae*) También, se descargaron secuencias correspondientes al género *Leptonema* y *Turneriella*.

Las secuencias, de aproximadamente 1500pb, se alinearon con el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.1.3.0 (Hall, 1999), herramienta ClustalW Multiple Alignment, y se obtuvieron secuencias consenso para los distintos grupos de interés. Se diseñaron sets de primers y sondas para la detección del género *Leptospira*, para el grupo de especies patógenas, para el grupo de especies de patogenicidad desconocida y otro, para la especie más frecuente en nuestro país.

9.4.4 Determinación de la temperatura óptima de annealing

Se ejecutaron reacciones de PCR en tiempo real siguiendo el protocolo de ciclado y preparación de la mezcla de reacción sugeridos por el fabricante de la polimerasa, como prueba general de los oligonucleótidos diseñados. Se utilizaron muestras de ADN de las distintas cepas de *Leptospira* spp. como controles positivos (Tabla 7), agua calidad biología molecular como control negativo y las muestras de ADN de las cepas ATCC (punto 9.4.1.3). Se utilizaron extractos de ADN de *L. borgpetersenii* (Pat 1), *L. interrogans* (Pat 2), *L. kirschneri* (Pat 3), *L. noguchii* (Pat 18), *L. biflexa* (Sap 12), *L. broomii* (Int b), *L. wolffii* (Int w), donde Pat hace referencia a especies patógenas, Sap a especies saprófitas e Int a especies de patogenicidad desconocida.

Las reacciones de amplificación se realizaron con 500 nM de cada primer, 500nM de sonda tipo TaqMan, 1X de IQ™ supermix (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y 5 µl de ADN molde, en un volumen final de 20 µl. Se utilizaron los primers y sondas diseñadas en el punto 9.4.3. El

ciclado se ejecutó en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y consistió en un ciclo de 2min a 50°C, seguido de un ciclo de 10min a 95°C y luego, 40 ciclos de 15seg a 95°C y 1min a Ta°C. La temperatura de annealing (Ta) seleccionada para los ciclados fue la temperatura de melting más baja de los oligonucleótidos involucrados en cada reacción. Se consideró una reacción positiva cuando se observó una curva con un valor de Ct menor a 40.

Luego de la prueba general, se procedió a determinar la temperatura de annealing óptima para cada reacción de PCR en tiempo real mediante gradientes de temperatura. Según las sugerencias del fabricante de la polimerasa utilizada, se realizaron amplificaciones con 500 nM de cada primer/cebador, 500nM de sonda tipo TaqMan, 1X de IQTM supermix (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y 25ng de ADN molde, en un volumen final de 20 µl. Como ADN molde, se utilizaron las muestras de ADN de las distintas cepas de *Leptospira* spp. (controles positivos), agua calidad biología molecular como control negativo y ADN de las cepas ATCC. Se utilizaron los primers y sondas diseñadas en el punto 9.4.3. El ciclado se ejecutó en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y consistió en un ciclo de 2min a 50°C, seguido de un ciclo de 10min a 95°C y luego, 40 ciclos de 15seg a 95°C, 1min con gradiente de temperatura. Se programó el termociclador para que realice un gradiente de temperatura específico para cada reacción.

9.4.5 Determinación de las condiciones óptimas de reacción

Las condiciones óptimas para las 4 reacciones de amplificación se determinaron mediante el Método Taguchi, ampliamente utilizado para la optimización de procesos industriales, adaptado y aplicado en técnicas de biología molecular (Cobb & Clarkson, 1994; Morero et al., 2021; Thanakiatkrai & Welch, 2012). A diferencia de los métodos factoriales, este enfoque alternativo permitió identificar las condiciones más apropiadas minimizando el número de experimentos, tiempo y esfuerzo (Morero et al., 2021). Además, mediante una función matemática que penaliza las pequeñas desviaciones de un valor objetivo teórico, se calculó la relación señal/ruido (S/N, del inglés: *signal/noise*) y se estimó la “pérdida de calidad”. Según el objetivo del experimento, existen tres tipos de relación S/N: mayor es mejor, menor es mejor y nominal es mejor, en este estudio se consideró la relación S/N: mayor es mejor.

Se ensayaron tres niveles de las variables para cada reacción de amplificación, siguiendo un arreglo ortogonal que contempló la ejecución de 9 experimentos que combinaron 3 variables a tres niveles distintos. Se ensayaron distintas concentraciones de oligonucleótidos (primers, sondas o primer blocker), de 100 a 500 nM, y distintas concentraciones de ADN molde (de 25 a 75ng). Según la propiedad de los arreglos ortogonales, cada combinación de niveles (A, B y C) ocurrió un número igual de veces. En la Tabla 8 se describe la matriz ortogonal utilizada para la optimización.

Tabla 8: Matriz ortogonal, combinación de tres niveles (A, B y C) de las cuatro variables estudiadas

Experimento n°:	Variables			
	Primers (nM)	sonda (nM)	*blocker (nM)	ADN molde (ng)
1	A: 100	A: 100	A: 100	A: 25
2	A: 100	B: 300	B: 300	B: 50
3	A: 100	C: 500	C: 500	C: 75
4	B: 300	A: 100	B: 300	C: 75
5	B: 300	B: 300	C: 500	A: 25
6	B: 300	C: 500	A: 100	B: 50
7	C: 500	A: 100	C: 500	B: 50
8	C: 500	B: 300	A: 100	C: 75
9	C: 500	C: 500	B: 300	A: 25

* esta variable se incorporó en los experimentos de optimización de la qPCR diseñada para la detección de *L. interrogans*

El ciclado se ejecutó en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, California, EEUU) y consistió en un ciclo de 2min a 50°C, seguido de un ciclo de 10min a 95°C, luego 40 ciclos de 15seg a 95°C y un ciclo final de 1min a Ta°C. En los ciclados de cada reacción se utilizó la temperatura de annealing determinada mediante el gradiente de temperaturas descrito en el punto 9.4.3. Las reacciones se realizaron por duplicado, con controles positivos (muestras de ADN de las cepas de *Leptospira* spp.), un control negativo (agua calidad biología molecular) y un control de reactivos (ausencia de ADN molde). Se registró el valor de Ct de cada experimento y se calculó la proporción señal/ruido (S/N) para cada experimento, según la siguiente ecuación:

$$S/N \text{ ratio: } -10 \times \log_{10}(\sum y^2 / r)$$

donde r: número de replicados, y: variable de respuesta (valor de Ct).

Se consideró un valor de Ct igual a 120 minutos en las reacciones en las que no se obtuvo amplificación. Se consideraron óptimas a aquellas condiciones de reacción que minimizaron el valor Ct y maximizaron la relación señal/ruido (Morero et al., 2021).

Se ejecutaron reacción qPCR con las temperaturas de annealing óptimas determinadas en el punto 9.4.4, los valores óptimos de cada variable determinados en el punto 9.4.5.1 y las muestras de ADN provenientes de las cepas de *Leptospira* spp. (Tabla 7) y cepas ATCC de otros géneros bacterianos (punto 9.4.1.3).

9.5 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

9.5.1 Tampón Tris Acetato EDTA (TAE)

En este estudio se utilizó el tampón TAE 1X para la preparación del gel de agarosa y como buffer de migración en la cuba de electroforesis. La composición del buffer TAE 1X es la siguiente:

- Tris-acetato.....40 mM
 - EDTA.....1 mM
- pH=8,3

9.5.2 Medio de cultivo *Ellinghausen McCullough Johnson Harris* (EMJH)

Se utilizó el medio de cultivo EMJH para la dilución de una cepa de referencia antes de su recuento en cámara de Neubauer, para el mantenimiento de cepas de referencia y aislamientos autóctonos. El medio EMJH enriquecido se elaboró con 9 partes de medio base (Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH) y 1 parte de suplemento de enriquecimiento, de elaboración propia.

Composición por litro del medio base utilizado para la elaboración del EMJH enriquecido-Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH (BD, France):

- Fosfato disódico (Na_2HPO_4).....1.0g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4).....0.3g
- Cloruro de sodio (ClNa).....1.0g
- Cloruro de amonio (ClNH_4).....0.25g
- Tiamina (Vit B1).....5.0mg

El EMJH enriquecido se elaboró de la siguiente manera (volumen final 1 litro):

- Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH (BD, France).....2.3g
- H₂O destilada900ml
- Solución de piruvato de sodio (10%p/v).....1ml
- Solución de glicerol (8%v/v).....1ml
- Agar*.....2.5g

*Se agregó agar a la solución anterior, en el caso de preparar EMJH enriquecido semisólido. La solución se colocó en baño María, hasta la disolución completa del agar.

Esta solución se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y luego, en condiciones de esterilidad y una vez que el medio base alcanzó los 50°C, se incorporaron 100 ml de Suplemento de enriquecimiento. El medio se fraccionó en tubos estériles de 10ml.

El Suplemento de enriquecimiento se elaboró de la siguiente manera (volumen final 100ml):

- Albúmina sérica bovina fracción V (Roche Diagnostics GmbH).....10g
- Solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ estéril.....1ml
(1.5g de cloruro de calcio + 1.5g de cloruro de magnesio en 100 ml de agua)
- Solución de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ estéril (0.4%p/v).....1ml
- Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ estéril (0.3%p/v).....1ml
- Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ estéril (0.05%p/v preparada em el momento).....1ml
- Solución de Tween 80 (9%v/v) estéril.....12.5ml
- Solución de Cianocobalamina B12 estéril (0.02%p/v).....1ml

Una vez que la albúmina se disolvió completamente, la solución se trasvasó a un matraz aforado de 100ml y se completó el volumen con agua destilada estéril. Se ajustó el pH a 7.2 - 7.4 y se esterilizó mediante filtración, en botellas con filtros de 0.22 μm .

9.5.3 Medio de cultivo Agar *Cysteine lactose electrolyte deficient* (CLDE)

Se utilizó el agar CLDE para el mantenimiento de las cepas ATCC. A continuación, se detalla la composición de este medio para un volumen final de 1000ml:

- Peptona4.0g
- Extracto de carne3.0g
- L-Cistina.....0.128g
- Tripteína.....4.0g
- Azul de bromotimol.....0.02g
- Lactosa.....10.0g
- Agar.....15.0g
- Agua purificada.....1000ml

pH final: 7.3 ± 0.2

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Acta 02/16, 10 de marzo.

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ARN ribosomal 16S

A continuación se describen los resultados obtenidos en los ensayos realizados para optimizar el método ARN ribosomal 16S descrito por Mérien et al. (1992) y Varni et al. (2018).

10.1.1 Detección de inhibidores de la reacción de amplificación

Las muestras de ADN M1 y M2 seleccionadas del panel del INER, se ensayaron mediante qPCR LipL32 para confirmar la existencia de ADN de *Leptospira* spp. y ambas muestras resultaron positivas. Se obtuvieron los siguientes valores de Ct para las amplificaciones de los genes *lipL32* y *rnaseP*: 24.33 y 27.67 para la muestra M1; 34.99 y 28.59 para la muestra M2. Estos resultados demostraron que M1 y M2 podían utilizarse como ADN molde en los ensayos siguientes.

Las muestras de ADN M1 y M2, un control negativo (agua calidad biología molecular) y una mezcla homogénea de M1 y M2 en partes iguales (M3), se ensayaron con el protocolo original de la técnica de amplificación del gen *rrs* (punto 9.1.2.1) para evaluar la presencia de inhibidores. Luego de ensayar las M1, M2 y M3 con el protocolo original del ARNr 16S, los productos de amplificación de las muestras M1 y M3 generaron bandas electroforéticas de 331pb, aproximadamente. En cambio, la M2 no generó productos de amplificación visibles en el gel de agarosa. La electroforesis de los productos de amplificación se muestra en la Figura 5. La amplificación del gen *rrs* en la muestra M3 sugiere que la reacción de amplificación no presentaba inhibidores.

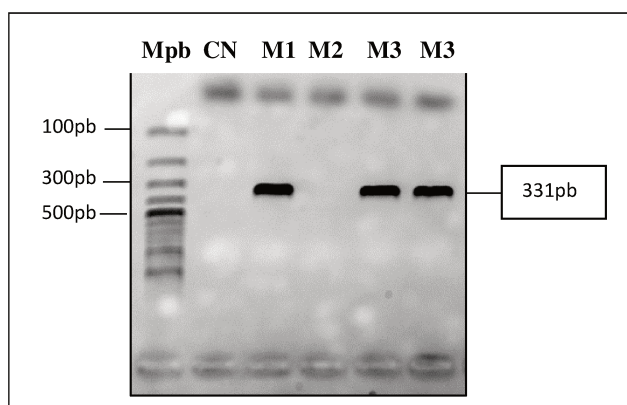


Figura 5: Electroforesis del gen *rrs*. Detección de inhibidores de la reacción. Mpb: Marcador de peso molecular. CN: control negativo. M1: muestra de ADN1. M2: muestra de ADN2. M3: mezcla M1 y M2.

10.1.2 Evaluación de distintas enzimas de amplificación

Luego de ensayar las M1 y M2 con el protocolo original del ARNr 16S y dos enzimas de amplificación diferentes, se observó una banda electroforética de 331pb aproximadamente, correspondiente al producto de amplificación de la muestra M1. No se observó banda electroforética correspondiente al producto de amplificación de la muestra M2. La electroforesis

de los productos de amplificación se muestra en la Figura 6. Estos resultados concuerdan con los anteriores por lo que, la utilización de otra enzima de amplificación no modificó el desempeño del método.

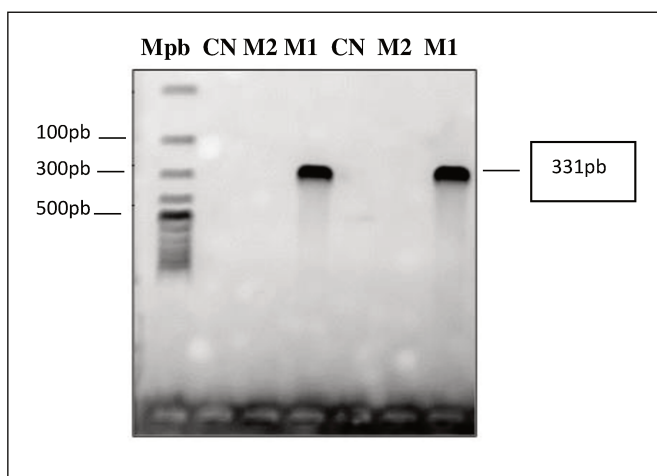


Figura 6: Electroforesis del gen *rrs*. Evaluación de dos enzimas de amplificación. Mpb: Marcador de peso molecular. CN: control negativo. M1: muestra de ADN1. M2: muestra de ADN2.

10.1.3 Evaluación del límite de detección

La Figura 7 representa el gráfico obtenido con los valores de Ct de qPCR LipL32 y las concentraciones 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 *Leptospira* sp./ml de la curva de calibrado. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = -3.18X + 40.94$. Con el valor de pendiente igual a -3.18, el valor de eficiencia resultó 104%. Este valor se consideró aceptable por lo que, al haber ensayado las muestras de ADN de la curva de calibrado con una técnica validada con anterioridad, la curva resultó de buena calidad.

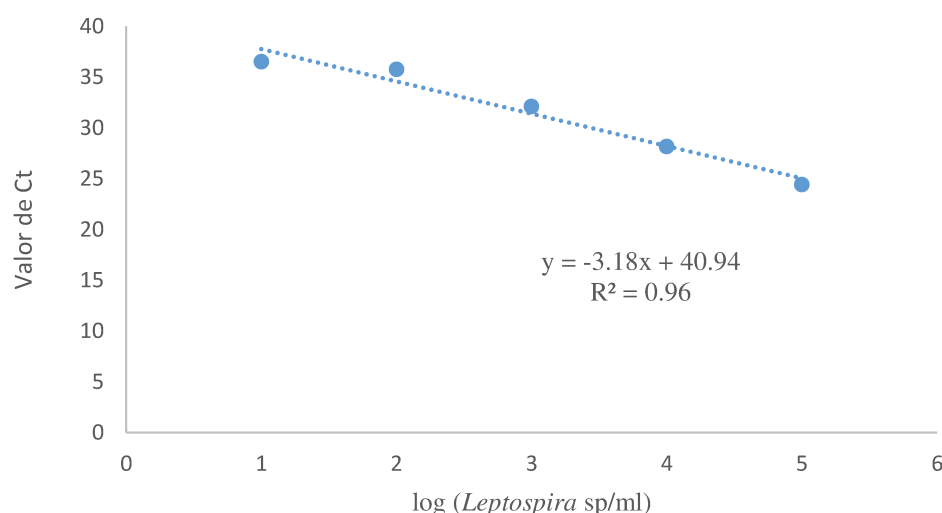


Figura 7: Evaluación de la calidad de la curva de calibrado mediante qPCR LipL32. Ecuación de la recta.

Luego de ensayar todas las muestras de ADN que formaban parte de la curva de calibrado,

siguiendo el protocolo original de la técnica ARNr 16S, las muestras de ADN correspondientes a 10^3 , 10^4 y 10^5 *Leptospira* sp./ml generaron productos de amplificación visibles en los geles de agarosa. Se observaron bandas electroforéticas de 331pb aproximadamente, para estas tres muestras de ADN. La electroforesis de los productos de amplificación se muestra en la Figura 8. El límite de detección de la técnica ARNr 16S resultó 10^3 *Leptospira* sp./ml.

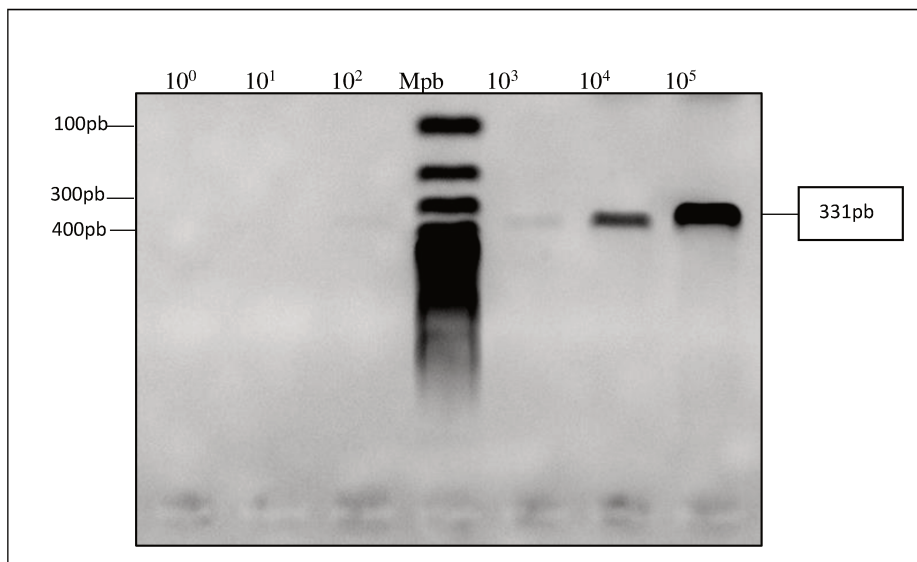


Figura 8: Electroforesis del gen *rrs*. Protocolo original: límite de detección. Mpb: Marcador de peso molecular. 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 : muestras de ADN correspondientes a la cantidad por ml, de la cepa Hond Utrecht IV de *Leptospira interrogans*.

10.1.4 Determinación de las condiciones óptimas de reacción

Sólo se observaron bandas electroforéticas de 331pb aproximadamente, en las muestras de ADN correspondientes a 10^4 *Leptospira* sp./ml, concentración inmediatamente superior al límite de detección, luego de realizar los 18 experimentos en los que se combinaron tres temperaturas de annealing y tres concentraciones de dNTPs, primer A y primer B, según la matriz ortogonal.

En 9 experimentos se utilizó un extracto de ADN correspondiente 10^2 *Leptospira* sp./ml y en otros 9 experimentos, 10^4 *Leptospira* sp./ml (concentración inmediatamente inferior y superior al límite de detección, respectivamente), no se obtuvieron productos de amplificación con las muestras de ADN correspondientes a 10^2 *Leptospira* sp./ml. La electroforesis de los productos de amplificación se muestra en la Figura 9.

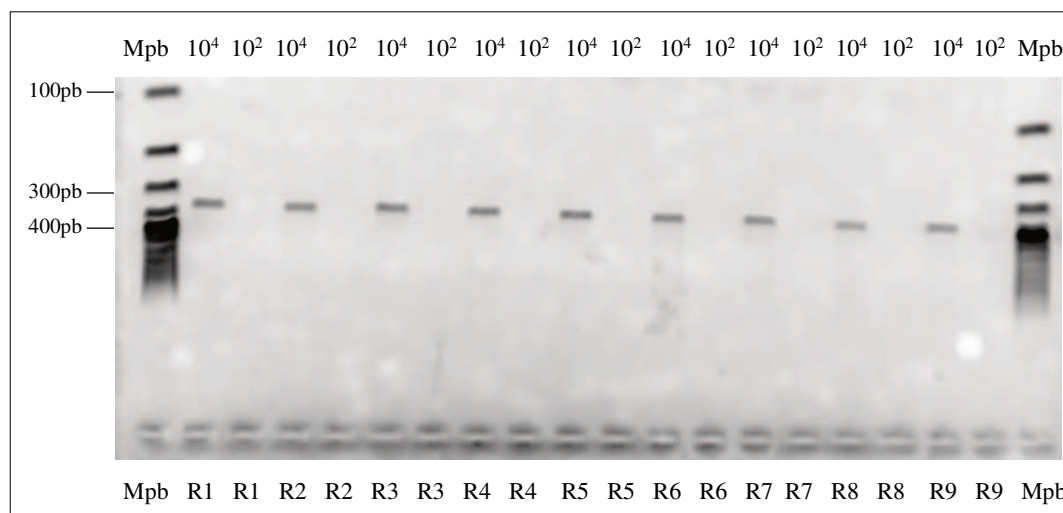


Figura 9: Electroforesis del gen *rrs*. Modificación de las condiciones de reacción. Mpb: Marcador de peso molecular. $10^2, 10^4$ correspondientes a *Leptospira* sp/ml. R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9: reacciones de amplificación con distintas combinaciones de variables según matriz ortogonal.

Debido a que no se obtuvieron productos amplificados con la muestra de ADN correspondiente a la concentración inmediatamente inferior al límite de detección, las distintas combinaciones de temperaturas de annealing, concentraciones de primers y dNTPs, no modificaron el desempeño de la técnica ARNr 16S evaluada.

Durante la etapa de optimización del ARNr 16S se determinó que las concentraciones de primers, dNTPs y la temperatura de annealing descriptas en el protocolo original resultaron ser las condiciones óptimas. Por ello, se decidió aplicar el protocolo original de la técnica ARNr 16S descripta por Mérien et al. (1992) y Varni et al. (2018) para dar cumplimiento al resto de los objetivos del estudio.

10.2 IDENTIFICACIÓN DE *Leptospira* spp. EN MUESTRAS DE SUERO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS MOLECULARES ARNr 16S Y MLST OPTIMIZADOS

Los métodos de tipificación molecular, el análisis del ARNr 16S y un esquema MLST optimizados, se aplicaron en las 228 muestras de ADN obtenidas a partir de muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina, durante el período 2005 – 2016.

10.2.1 ARN ribosomal 16S (ARNr 16S)

Luego del procesamiento bioinformático de las secuencias obtenidas y comparación con la base de datos RDP y se logró identificar la especie del género *Leptospira* causante de enfermedad en 50 muestras. Las secuencias presentaron similitud con *L. interrogans* (n=49) y *L. borgpetersenii* (n=1). Los resultados de la tipificación se detallan en la Tabla 9.

En un estudio previo del LNRL (Chiani et al., 2016) se aplicó el método ARNr 16S en muestras de suero y sangre entera que disponían de resultados previos positivos para la qPCR LipL32. En cambio, en el presente trabajo se aplicó el método ARNr 16S en muestras de suero sin resultados moleculares previos que aseguraran la existencia de ADN de *Leptospira* spp. en las mismas. Este protocolo de trabajo se estableció para evaluar el desempeño del método en el tipo de muestra más accesible en los laboratorios que realizan el diagnóstico de leptospirosis, considerando que gran parte de los casos de nuestro país se confirman serológicamente. Además, en este estudio se aplicó el ARNr 16S en muestras sin resultados moleculares previos con el objetivo de ampliar la búsqueda a otras especies diferentes a las patógenas, es decir, también incluir a las especies saprófitas y de patogenicidad desconocida, y minimizar los recursos necesarios para lograr la identificación del agente causal.

Gran parte de los estudios reportan diferentes estrategias de tipificación, utilizando diferentes tipos de muestra y variantes de los métodos, con el fin de detectar únicamente a las especies patógenas (Agampodi et al., 2011, 2014; Boonsilp et al., 2011; Y. Chiani et al., 2016; Merien et al., 1995, 2005; Mérien, Amouriaux, Perolat, Baranton, & Saint Girons, 1992; Thaipadunpanit et al., 2011b; Varni et al., 2018). Sin embargo, estas estrategias no permiten conocer con certeza la utilidad de los métodos para identificar todas las especies del género *Leptospira*. El protocolo planteado en este estudio tiene la ventaja de permitir identificar el agente causal de la enfermedad sin importar la patogenicidad de la especie responsable y sin depender del desempeño de otros métodos moleculares que habitualmente se utilizan como tamiz.

Por otro lado, considerando que sólo el 40% de las secuencias obtenidas con el ARNr 16S presentaron similitudes superiores al 95%, sería conveniente realizar la validación diagnóstica del método para determinar la especificidad del mismo cuando es aplicado en muestras clínicas, incluyendo mayor cantidad de pacientes con leptospirosis confirmada por cultivo. En este estudio se hizo una evaluación preliminar de este desempeño cuyos resultados se detallan luego, pero con muy poca cantidad de pacientes, debido a que el requisito de confirmación de la enfermedad por cultivo es el factor limitante. También sería conveniente utilizar un método de genotipificación adicional para confirmar la especie identificada mediante el ARNr 16S. Según resultados que se expondrán luego, la aplicación conjunta del MLST resultó de utilidad para resolver esa necesidad.

10.2.2 Multilocus sequence typing (MLST)

El gen *glmU* se amplificó en 43 de las 228 muestras de ADN que se ensayaron con 2 reacciones PCR de punto final anidadas. Los productos amplificados generaron bandas electroforéticas de 598pb, aproximadamente, y los controles negativos y positivos resultaron según los esperado.

Las reacciones de amplificación de los 6 genes restantes (*caiB*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA*) se realizaron en esas 43 muestras *glmU* positivas. En 7 de estas muestras, el ARNr 16S resultó negativo. Los siete genes del esquema MLST se amplificaron en 26 muestras, 2 de estas muestras

resultaron ARNr 16S negativas. En el resto (n=17) no se logró completar el esquema, pero se amplificaron al menos 2 genes. Los productos amplificados generaron bandas de aproximadamente 589, 607, 552, 555, 540 y 568pb según el gen amplificado.

Luego del procesamiento bioinformático y la comparación con la base de datos PubMLST, en las 26 muestras con el esquema MLST completo se obtuvo la Secuencia Tipo correspondiente (ST), en 24 muestras con un perfil de 7 alelos y en 2, con 6 alelos. En estas dos últimas muestras, la mala calidad de la secuencia de un gen determinó la asignación de la ST con un alelo menos. En total, se obtuvieron 8 STs diferentes: ST37 (n=12; 46.2%), ST20 (n=4; 15.4%), ST17 (n=3; 11.6%), ST13 (n=3; 11.6%), ST38 (n=1; 3.8%), ST149 (n=1; 3.8%), ST140 (n=1; 3.8%) y ST37/118 (n=1; 3.8%). En la Tabla 9 se describen los resultados obtenidos con el esquema MLST. Con las STs obtenidas, en 26 muestras se asignó la especie del género *Leptospira* y en 24, también se definió el serogrupo probable. Se identificó la especie *L. interrogans* en 25 muestras (asignada por 7 STs diferentes) y *L. borgpetersenii* en una (asignada por 1 ST). Respecto a los serogrupos, los STs asignaron 6 serogrupos diferentes Canicola (n=12), Sejroe (n=4), Icterohaemorrhagiae (n=3), Pyrogenes (n=3), Pomona (n=1) y Ballum (n=1).

Estos resultados sugieren la posible circulación de múltiples genotipos y serogrupos de *Leptospira* en Argentina.

El esquema MLST asignó la especie y el serogrupo de *Leptospira* spp. en 2 muestras que resultaron ARNr 16S negativas. Esto podría deberse a la sensibilidad diferencial de los dos métodos cuyos genes objetivos son distintos. La tipificación en esas dos muestras se logró debido a que todas las muestras incluidas en el estudio también se procesaron por MLST. Si se hubiera utilizado el ARNr 16S como método tamiz, no se habría logrado esta tipificación.

El esquema MLST asignó las mismas especies que las identificadas por el método ARNr 16S. Además, el esquema MLST confirmó la especie de *Leptospira* spp. en el 53.33% de las muestras (n=16) que resultaron ARNr 16S positivas con *S_{ab} score* menor a 0.95.

En otros estudios (Agampodi et al., 2013; Chiani et al., 2016; Guernier et al., 2016; Mendoza & Rivera, 2021; Perez & Goarant, 2010; Philip et al., 2020; Varni et al., 2018; Weiss et al., 2016), los esquemas MLST se aplicaron en muestras con un resultado molecular previo positivo que aseguraba la existencia de ADN de especies patógenas del género *Leptospira*. Esto se debe a que los esquemas MSLT se desarrollaron para la identificación de este grupo de especies (Boonsilp et al., 2013b). En cambio, en el presente estudio se aplicó el esquema en todas las muestras incluidas, sin considerar resultados previos de algún método de tamizaje como podrían ser el ARNr 16S o la qPCR_{LipL32}. Para optimizar recursos, se amplificó el gen *glmU* en primer lugar y luego se amplificaron los demás genes del esquema sólo en las muestras positivas. Este protocolo de trabajo resultó favorable debido a que el esquema MLST asignó las especies responsables de la infección, en dos muestras en las que no se logró la identificación mediante el

análisis del ARNr 16S. Además se confirmaron las especies identificadas mediante ARNr16S y se identificaron los serogrupos probables.

Tabla 9: Identificación de *Leptospira* spp. con ARNr 16S y MLST, en muestras de suero de fase septicémica (n=228) de pacientes con leptospirosis. *S_{ab} score*: número de oligómeros únicos de 7 bases compartidos entre una secuencia y una secuencia RDP dada, dividido por el menor número de oligos únicos

Año	ID	Días de evolución	ARNr 16S		MLST										Serogrupo Probable
			Especie	<i>S_{ab} score</i>	Esquema MLST	Perfil alélico								ST	
						glmU	pntA	sucA	tpiA	pfkB	mreA	caiB			
2007	832	3	<i>L. interrogans</i>	0.947	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2007	836	7	<i>L. interrogans</i>	0.815	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2007	858	4	<i>L. interrogans</i>	0.956	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2009	880	5	<i>L. interrogans</i>	0.927	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2009	883	6	<i>L. interrogans</i>	0.901	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	890	2	<i>L. interrogans</i>	0.963	Completo	3	3	3	32	4	5	5	37/118 ^a		Canicola/Hebdomadis
2010	894	4	<i>L. interrogans</i>	0.969	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	895	5	<i>L. interrogans</i>	0.969	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	896	4	<i>L. interrogans</i>	0.972	Completo	1	1	2	1	7	4	3	20		Sejroe
2010	903	5	<i>L. interrogans</i>	0.997	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	910	6	<i>L. interrogans</i>	0.978	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	911	1	<i>L. interrogans</i>	0.963	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2010	357	2	<i>L. interrogans</i>	0.930	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2011	915	6	<i>L. interrogans</i>	0.954	Completo	1	1	1	5	12	2	9	13		Pyrogenes
2011	920	3	<i>L. interrogans</i>	0.929	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2011	92	6	<i>L. interrogans</i>	0.526	Completo	1	1	1	5	12	2	9	13		Pyrogenes
2012	404	7	<i>L. interrogans</i>	0.909	Completo	1	1	1	5	-	2	9	13 ^b		Pyrogenes
2012	407	3	<i>L. interrogans</i>	0.883	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2012	408	6	<i>L. interrogans</i>	0.981	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2012	406	4	<i>L. interrogans</i>	0.985	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2012	410	3	<i>L. interrogans</i>	0.930	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola
2012	412	3	<i>L. interrogans</i>	0.626	Completo	-	3	2	9	4	6	8	38 ^b		Pomona
2013	925	6	<i>L. interrogans</i>	0.972	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2013	936	1	<i>L. interrogans</i>	0.628	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2013	937	7	<i>L. interrogans</i>	0.721	Completo	1	1	2	1	7	4	3	20		Sejroe
2013	372	4	<i>L. interrogans</i>	0.994	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2013	415	5	<i>L. interrogans</i>	0.930	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37		Canicola

2014	943	3	<i>L. interrogans</i>	0.643	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2014	944	7	<i>L. interrogans</i>	0.912	Completo	1	1	2	1	7	4	3	20	Sejroe
2014	946	6	<i>L. interrogans</i>	0.905	Completo	1	1	2	1	7	4	3	20	Sejroe
2014	948	4	<i>L. interrogans</i>	0.782	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2014	513	4	<i>L. interrogans</i>	0.818	Completo	1	1	2	2	10	4	8	17	Icterohaemorrhagiae
2014	519	5	<i>L. interrogans</i>	0.351	Completo	1	1	5	5	10	4	8	17	Icterohaemorrhagiae
2014	538	4	<i>L. interrogans</i>	0.969	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2015	957	4	<i>L. interrogans</i>	0.688	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2015	958	7	<i>L. interrogans</i>	0.688	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37	Canicola
2015	978	5	<i>L. interrogans</i>	0.920	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37	Canicola
2015	986	2	<i>L.borgpetersenii</i>	0.963	Completo	24	32	30	36	67	26	12	149	Ballum
2015	988	2	<i>L. interrogans</i>	0.912	Completo	1	1	2	2	10	4	8	17	Icterohaemorrhagiae
2015	992	4	<i>L. interrogans</i>	0.556	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37	Canicola
2015	676	7	<i>L. interrogans</i>	0.687	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37	Canicola
2016	748	5	<i>L. interrogans</i>	0.948	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	1132	2	<i>L. interrogans</i>	0.963	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	750	7	<i>L. interrogans</i>	0.960	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	751	4	<i>L. interrogans</i>	0.987	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	752	5	<i>L. interrogans</i>	0.732	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	759	2	<i>L. interrogans</i>	0.878	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	1138	4	<i>L. interrogans</i>	0.951	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	778	4	<i>L. interrogans</i>	0.969	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2016	784	6	<i>L. interrogans</i>	0.910	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2007	843	4	Negativo	-	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2007	862	7	Negativo	-	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2007	131	4	Negativo	-	Completo	3	3	3	3	4	5	16	140	Pomona,Grippotyphosa,Pyrogenes
2008	871	1	Negativo	-	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	900	2	Negativo	-	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2010	180	4	Negativo	-	Completo	3	3	3	3	4	5	5	37	Canicola
2012	427	7	Negativo	-	Incompleto	-	-	-	-	-	-	-	-	NC

^a: el perfil alélico obtenido comparte 6 alelos con ST37 y 6 alelos con ST118, con una variante una variante de *sucA* y *caiB*, respectivamente. ST^b: secuencia tipo obtenida con un perfil de 6 alelos, se obtuvo baja calidad en la secuencia de un gen.

10.2.3 Determinación de la frecuencia relativa de las especies y serogrupos del género *Leptospira* identificadas mediante ARNr 16S y MLST

En 52 (22.8%) muestras de suero de pacientes con leptospirosis se identificó la especie del agente etiológico por ambos métodos, *L. interrogans* en el 98.1% (n=51) y *L. borgpetersenii* en el 1.9% (n=1). Las especies causales se identificaron sólo mediante ARNr 16S en 26 muestras, con ARNr 16S y MSLT en 24 y sólo con MLST en 2.

Según otros estudios, las especies identificadas son dos de las tres especies patógenas identificadas con mayor frecuencia como agentes causantes de leptospirosis en todo el mundo (Boonsilp et al., 2013b) y son consistentes con las especies reportadas en Argentina en humanos y animales (Y. Chiani et al., 2016; Colombo et al., 2018; Loffler et al., 2014; Ricardo et al., 2018; Rossetti et al., 2005; Scialfa et al., 2013; Varni et al., 2018).

Por otro lado, en 24 muestras se identificaron 6 serogrupos probables diferentes mediante MLST. Se identificó el serogrupo Canicola en mayor proporción (50%), seguido de Sejroe (16.6%), Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes (12.5% cada uno) y luego, Pomona y Ballum (4.2% cada uno). En dos muestras no se diferenció el serogrupo probable, a pesar de haber obtenido un esquema MLST completo y un perfil alélico de 7 genes. En una de esas muestras se identificó la ST140 que incluye a los serogrupos Pomona, Grippotyphosa, Pyrogenes. En la otra, se obtuvo una secuencia tipo ambigua (ST37/118) con un perfil alélico que compartía 6 alelos con ST37, 6 alelos con ST118 y variantes de los genes *sucA* y *caiB*, respectivamente.

A diferencia de lo tipificado con ARNr 16S, con el esquema MLST se identificó mayor diversidad de genotipos y se profundizó la clasificación taxonómica de las especies identificadas a nivel de serogrupo.

La utilización de los dos métodos genotípicos en paralelo, a ciegas y sin utilizar un método de tamizaje, permitió identificar especies y serogrupos responsables de casos de leptospirosis en Argentina durante un período de 12 años, a partir de muestras de suero y sin necesidad de aislamientos.

10.2.4 Georreferenciación de las especies y serogrupos del género *Leptospira* identificadas mediante ARNr 16S y MLST

Considerando los domicilios declarados en las fichas epidemiológicas derivadas con las muestras de suero o los registrados en SISA, con el Sistema de Información Geográfica QGIS 3.40.3 se asignaron ubicaciones espaciales a los 52 casos de leptospirosis en los que se pudo identificar la especie bacteriana causal mediante el ARNr 16S (n=50) y el esquema MLST (n=2). Estos casos se distribuyeron geográficamente de la siguiente manera: Santa Fe (21; 40.38%), Entre Ríos (16; 30.77%), Chaco (7; 13.46%), Río Negro (3; 5.77%), Buenos Aires (2; 3.85%), Córdoba (2; 3.85%) y Neuquén (1, 1.92%). En la Figura 10 se observa la distribución geográfica de las especies identificadas.

La mayor cantidad de casos se encuentran localizados en las dos provincias que tradicionalmente registran el mayor número de casos, Santa Fe y Entre Ríos (Figura 11).

Debido a que no se identificó diversidad de especies bacterianas, no fue posible establecer algún patrón de distribución diferencial a nivel de especie. El único caso de leptospirosis en el que se identificó a *Leptospira borgpetersenii* como agente causal, se localizó en la provincia de Santa Fe.



Figura 10: Especies del género *Leptospira* identificadas en muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada, Argentina, 2005 a 2016. Mapa creado con QGIS, software gratuito y de código abierto.

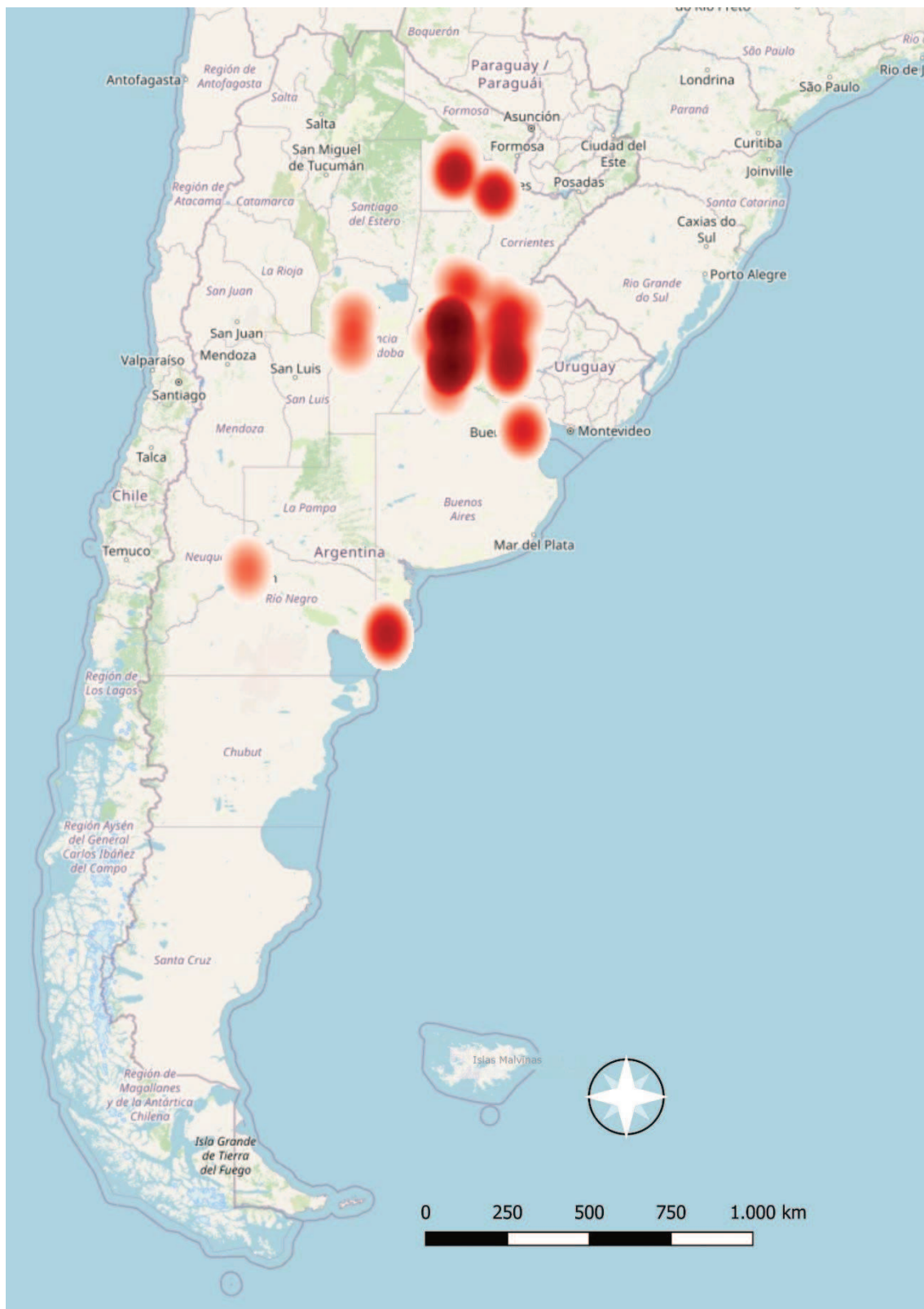


Figura 11: Mapa de calor, distribución de todas las especies del género *Leptospira* identificadas en muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada, Argentina, 2005 a 2016. Mapa creado con QGIS, software gratuito y de código abierto.

También se ubicaron espacialmente a los 26 casos en los que se asignó una secuencia tipo con el esquema MLST. Las STs se distribuyeron geográficamente de la siguiente manera: ST13 (Santa Fe: 2, Chaco: 1), ST17 (Entre Ríos: 2, Santa Fe: 1), ST20 (Chaco: 3, Santa Fe: 1), ST37 (Santa

Fe: 7, Entre Ríos: 4, Río Negro: 1), ST38 (Santa Fe: 1), ST149 (Santa Fe: 1), ST140 (Entre Ríos: 1) y ST37/118 (Santa Fe: 1). En la Figura 12 se observa la distribución geográfica de las STs identificadas. En la Tabla 10 se describe la distribución de los serogrupos identificados en 24 de estas muestras.

Los serogrupo Canicola y Pyrogenes se identificaron con mayor frecuencia en la provincia de Santa Fe (7/12 y 2/3, respectivamente), Icterohaemorrhagiae en la provincia de Entre Ríos (2/3) y Sejroe en Chaco (3/4). Sin embargo, no se pudieron establecer patrones de distribución geográfica de los serogrupos de *Leptospira* spp. identificados en las muestras, posiblemente debido a la baja cantidad de muestras que pudieron tipificarse exitosamente a este nivel taxonómico. Estudios epidemiológicos futuros en los que se analicen períodos de tiempo diferentes podrían aportar un número significativo de datos que posibiliten la determinación de patrones de distribución geográfica diferencial a nivel de especie y serogrupo.

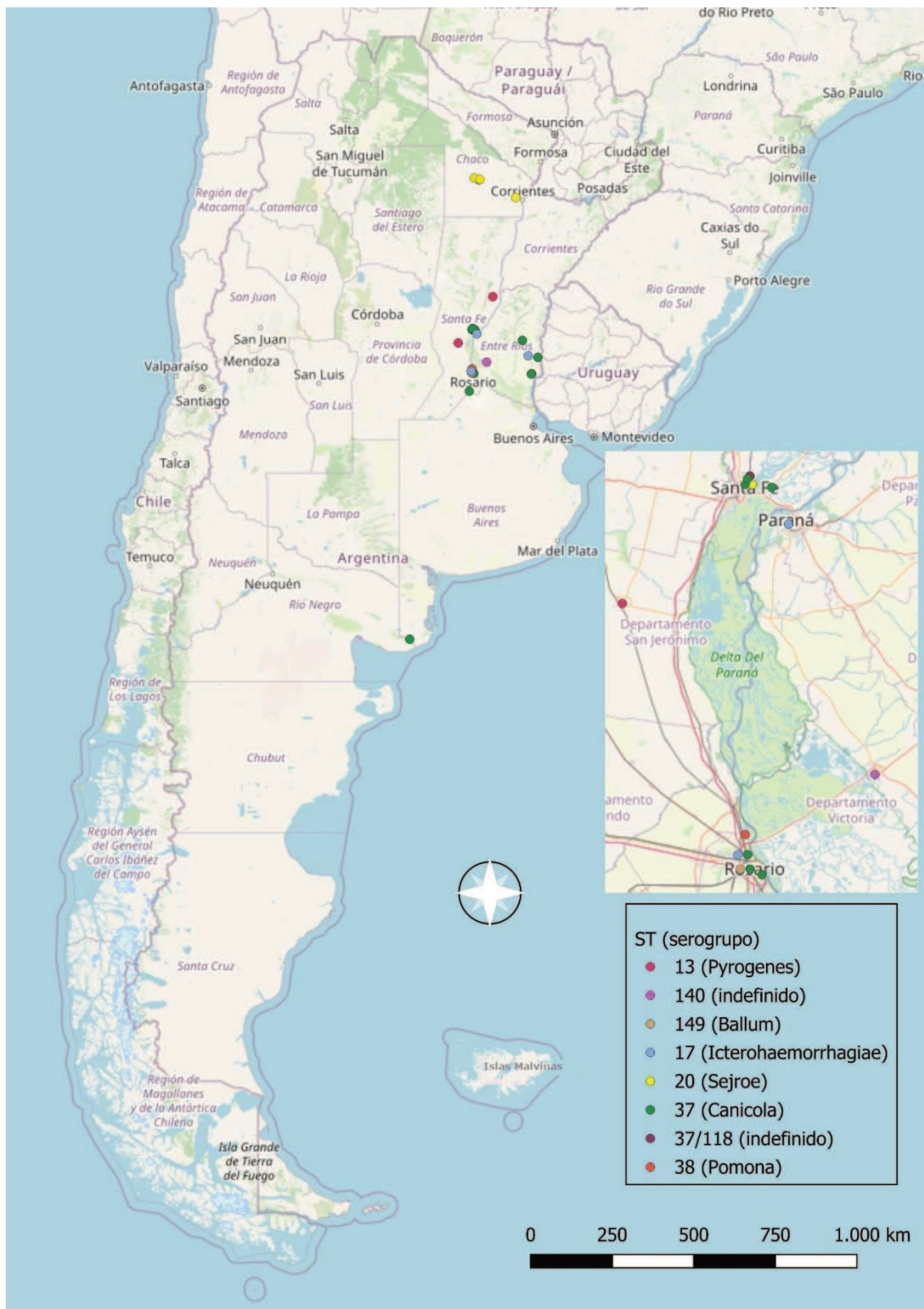


Figura 12: Secuencias Tipo (STs) y serogrupos probables de *Leptospira* spp., identificados mediante MLST en muestras de suero de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada, Argentina, 2005 a 2016. Mapa creado con QGIS, software gratuito y de código abierto.

Tabla 10: Distribución de serogrupos de *Leptospira* por provincia, en Argentina. Los serogrupos se identificaron mediante MLST, en 24 muestras de suero de pacientes con leptospirosis confirmada en Argentina durante el período 2005-2016.

Provincia	Serogrupo						Total
	Pyrogenes	Icterohaemorrhagiae	Sejroe	Canicola	Pomona	Ballum	
Santa Fe	2	1	1	7	1	1	13
Entre Ríos	0	2	0	4	0	0	6
Chaco	1	0	3	0	0	0	4
Río Negro	0	0	0	1	0	0	1
Total	3	3	4	12	1	1	24

10.3 EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN ARN ribosomal 16S y MLST

10.3.1 Tasa de éxito de tipificación

El método ARNr 16S identificó las especies de *Leptospira* responsables de la infección, en 50 de las 228 muestras de suero de fase septicémica de pacientes de Argentina, con leptospirosis confirmada durante el período 2005-2016. Según esto, la tasa de éxito de tipificación (TT) resultó 21.9%, IC [16.3–27.5]). En la Tabla 11 se detallan las TT para el período completo de estudio y para cada año estudiado.

La TT resultó aceptable en el contexto de este estudio. El método de genotipificación ARNr 16S se aplicó en muestras de suero que no tenían resultados moleculares previos, como qPCR LipL32, que indicaran la existencia de ADN de *Leptospira* spp. en las mismas y esto pudo influir desfavorablemente en las tasas de tipificación.

Al comparar con otros estudios, Boonsilp y col. (2013) reportaron una tasa de tipificación similar a la obtenida en este estudio. Estos autores aplicaron una PCR de punto final dirigida al gen *rrs* en muestras biológicas sin pruebas molecular previas, en un estudio con un tamaño de muestra relevante. Aunque estos autores estudiaron otro tipo de muestra sanguínea y amplificaron otra región del gen *rrs*, la tasa de positividad informada (28.2%) fue comparable con el 21.9% encontrado en el presente estudio. Philip y col. (2020) evaluaron la misma PCR anidada en muestras de suero y sangre de casos sospechosos. Por otro lado, Merien y col. (1995) amplificaron la misma región del gen *rrs* que la analizada en este estudio pero utilizando PCR anidada e hibridación Dot Blot y aunque estudiaron 28 muestras de suero sin ninguna técnica molecular previa, obtuvieron una tasa de positividad del 82.1%. Esta tasa elevada podría atribuirse a la PCR anidada y la hibridación Dot Blot que mejoraron el rendimiento del método Mérien y col. (1992). Thaipadunpanit y col. (2011) también informaron una tasa de positividad elevada (56%), pero utilizando PCR en tiempo real.

Los reportes anteriores y las siete muestras ARNr 16S negativas que resultaron MLST positivas,

sugieren que la sensibilidad de ARNr 16S debería mejorarse, especialmente si las estrategias de tipificación implican la aplicación del MLST sólo en muestras ARNr 16S positivas.

Respecto al método MLST, el gen *glmU* se amplificó en 43 de las 228 muestras de suero de fase septicémica de los pacientes estudiados, pero en 26 muestras se obtuvo el perfil MLST completo y la ST correspondiente. La TT del MLST resultó 11.4%, IC [7.1–15.7]). En la Tabla 10 se detallan las TT para el período completo de estudio y para cada año estudiado.

A diferencia de otros estudios, el método de genotipificación MLST se aplicó en todas las muestras de suero seleccionadas para el estudio, sin considerar ningún resultado molecular previo que indicara la existencia de ADN de *Leptospira* spp. en las mismas. Esto pudo influir desfavorablemente en las tasas de tipificación.

Para poder comparar estos resultados con los de otros autores que sólo estudiaron con MLST muestras con resultados moleculares positivos previos, también se calculó el porcentaje de muestras ARNr 16S positivas con esquema MLST completo e incompleto. Se obtuvo un esquema completo en el 48.0% (n= 24) de las muestras ARNr 16S positivas, e incompleto en el 38.0% (n=12). Incluso sin ninguna prueba de detección previa, la tasa de tipificación obtenida para el esquema MLST (11.4%), resultó similar o superior a las tasas reportadas por otros autores. Varni y col. (2018), Chiani y col. (2016) y Agampodi y col. (2013) reportaron 11.7%, 9.8% y 5.2%, respectivamente, aplicando diferentes esquemas de MLST y en muestras con resultados previos positivos para la detección de especies patógenas. Además, el porcentaje de muestras ARNr 16S positivas con perfil MLST completo (48%) obtenido en este estudio, fue mayor que todas las tasas mencionadas anteriormente e incluso mayor que las reportadas para el mismo esquema, 17.2% y 1.59% (Philip et al., 2020; Weiss et al., 2016). Respecto a los autores del esquema MLST aplicado (Weiss et al., 2016), en el presente estudio se estudió un número mayor de muestras de suero para mejorar la evaluación del desempeño del MLST.

Aunque la TT del esquema MLST aplicado resultó ser más alta que la TT reportada por otros autores, es más baja que la obtenida en este estudio para el ARNr 16S. A pesar de esto, el MLST presenta el valor agregado de profundizar la clasificación taxonómica del género *Leptospira* a nivel de serogrupo.

Tabla 11: Tasa de tipificación exitosa (TT) de *Leptospira* spp. en muestras de suero de fase septicémica (n=228) de pacientes con leptospirosis, mediante ARNr 16S y MLST, Argentina, 2005-2016.

Año	Muestras estudiadas	ARNr 16S			MLST		
		Muestras positivas	TT (%)	Especie (n° de muestras)	Perfil comp leto	TT (%)	ST (n° de muestras)
2005	2	0	0.0	NA	0	0.0	NA
2006	2	0	0.0	NA	0	0.0	NA
2007	44	3	6.8	<i>L. interrogans</i> (3)	2	4.5	ST37(1); ST140(1)
2008	9	0	0.0	NA	0	0.0	NA
2009	7	2	28.6	<i>L. interrogans</i> (2)	0	0.0	NA
2010	41	8	19.5	<i>L. interrogans</i> (8)	4	9.8	ST37(2); ST20(1); ST37/118(1)
2011	17	3	17.6	<i>L. interrogans</i> (3)	2	11.8	ST13(2)
2012	11	6	54.5	<i>L. interrogans</i> (6)	6	54.5	ST13(1); ST37(4); ST38(1)
2013	15	5	33.3	<i>L. interrogans</i> (5)	2	13.3	ST20(1); ST37(1)
2014	18	7	38.9	<i>L. interrogans</i> (7)	4	22.2	ST20(2); ST17(2)
2015	36	7	19.4	<i>L. interrogans</i> (6) <i>L. borgpetersenii</i> (1)	6	16.7	ST37(4); ST17(1); ST149(1)
2016	26	9	34.6	<i>L. interrogans</i> (9)	0	0.0	NA
2005 a 2016	228	50	21.9	<i>L. interrogans</i> (49) <i>L. borgpetersenii</i> (1)	26	11.4	ST37(12); ST20(4); ST17(3); ST13(3); ST38(1); ST140(1); ST37/118(1); ST149(1)

NA: no aplica

En ambos métodos de tipificación, ARNr 16S y MLST, se observó una tendencia de la tasa de tipificación en ascenso durante los 12 años estudiados. La baja tasa de tipificación en las muestras antiguas podría deberse a la degradación del ADN durante el almacenamiento prolongado y los ciclos repetidos de congelación y descongelación (Schröder & Steimer, 2018; Shao y col., 2012). Sin embargo, los bajos recuentos bacterianos en sangre, el corto período de bacteriemia o un error en la identificación de la fase de la enfermedad, pueden influir en las tasas de tipificación de todas las muestras.

10.3.2 Evaluación de la concordancia entre los métodos ARNr 16S y MLST

Para el cálculo del coeficiente kappa de Cohen se consideraron los resultados positivos y negativos de ambos métodos, según el éxito obtenido en la tipificación de *Leptospira* spp. (Tabla 12). La concordancia entre los resultados obtenidos con los métodos ARNr 16S y MLST resultó moderada (κ : 0.5665, IC 95%: 0.4289-0.7041).

Tabla 12: Concordancia entre ARNr 16S y MLST, resultados positivos y negativos obtenidos en muestras de suero de fase septicémica (n=228) de pacientes con leptospirosis, Argentina, 2005-2016.

	MLST positivo	MLST negativo	Total
16S ARNr positivo	24	26	50
16s ARNr negativo	2	176	178
Total	26	202	228

10.3.3 Comparación de los serogrupos identificados por MLST en las muestras de suero de fase septicémica, con los inferidos por MAT en las muestras de suero de fase inmune

En el 78.0% (n=124) de las muestras de suero de fase inmune se identificó el serogrupo presumiblemente infectante mediante MAT, y en 32 (20.1%) muestras resultó indefinido. En cambio, sólo se identificó el serogrupo probable en el 10.52% (n=24) de las muestras de fase septicémica.

El esquema MLST permitió la identificación del serogrupo de *Leptospira* spp. a partir del ADN bacteriano presente en las muestras de suero, a diferencia de la MAT que identificó los serogrupos indirectamente, mediante el análisis de los títulos de anticuerpos. A pesar de su menor porcentaje de identificación, el MLST aportó información más precisa que la MAT.

En la Tabla 13 se reportan las proporciones relativas de los serogrupos presumiblemente infectantes identificados por MAT en muestras de suero de la fase inmune y las proporciones relativas de los serogrupos probables identificados por MLST en las muestras de suero de fase septicémica. Los serogrupos presumiblemente infectantes determinados con mayor frecuencia por MAT fueron Sejroe, seguido de Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona.

Se observa coincidencia en los tres serogrupos más frecuentes (Canicola, Sejroe e Icterohaemorrhagiae) identificados en sueros de la fase septicémica por el método molecular (MLST) y los determinados en sueros de la fase inmune por el método serológico (MAT). Sin embargo, la frecuencia de los serogrupos varía según el método empleado y difieren de los serogrupos reportados previamente en Argentina (Vanasco et al., 2008).

Tabla 13: Proporción relativa de los serogrupos probables identificados por MLST y presumiblemente infectantes identificados MAT, en muestras de suero de fase septicémica y de fase inmune, respectivamente, de pacientes con leptospirosis, Argentina, 2005-2016.

Método	Serogrupos- ST	N° de muestras tipificadas	Proporción relativa (%)
MLST	Canicola-ST37	12	50.0
	Sejroe-ST20	4	16.6
	Icterohaemorrhagiae-ST17	3	12.5
	Pyrogenes-ST13	3	12.5
	Pomona-ST38	1	4.2
	Ballum-ST149	1	4.2
MAT	Sejroe	39	31.5
	Canicola	35	28.2
	Icterohaemorrhagiae	27	21.8
	Pomona	16	12.9
	Ballum	4	3.2
	Grippotyphosa	2	1.6
	Pyrogenes	1	0.8

10.3.4 Comparación de las variedades de *Leptospira* spp. identificadas en cultivos y muestras clínicas de fase septicémica

En 5 muestras clínicas de fase septicémica provenientes de pacientes con leptospirosis confirmada por cultivo (n=8), se identificó a *L. interrogans* como la especie causante de la enfermedad mediante ARNr 16S. Se identificó la misma especie en los dos tipos de muestra de fase septicémica de un mismo paciente, la muestra clínica y el aislamiento.

Respecto a los serogrupos causantes de la infección, en 4 muestras clínicas de fase septicémica se obtuvo el perfil MLST completo y en 1, el perfil incompleto. Se observaron coincidencias en los STs obtenidos en las muestras clínicas y los aislamientos correspondientes, excepto en un paciente, a nivel de serogrupo. En este caso, se identificó el serogrupo Canicola (ST37) en el aislamiento y Australis (ST120) en la muestra de suero.

La dificultad para identificar el serogrupo correcto a partir de la muestra de sangre podría deberse a que la ST37 y ST120 difieren sólo en el gen *pfbB*. La similitud de los dos alelos obtenidos para ese gen y la baja calidad de la secuencia obtenida podrían ser la razón de la tipificación de serogrupos diferentes en las dos muestras de un mismo paciente.

El esquema MLST no habría definido el serogrupo probable en un aislamiento del serogrupo Pomona, al asignar la ST140 (serogrupo probable: Pomona-Grippotyphosa-Pyrogenes-Hebdomadis). Sin embargo, estudios previos también reportaron la asignación de ST140 a aislamientos y cepas de referencia del serogrupo Pomona (Bertasio et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Guernier et al., 2016; Weiss et al., 2016), por lo que es necesario enriquecer las bases de datos disponibles con un mayor número de aislamientos de *Leptospira* spp. tipificados por métodos serológicos y genotípicos, con el fin de mejorar la asignación de STs y la identificación

de los serogrupos causales.

En la Tabla 14 se describen las variedades identificadas en dos tipos de muestra de fase septicémica provenientes de un mismo paciente, el suero y el aislamiento *Leptospira* spp. Posiblemente, la menor cantidad de ADN bacteriano existente en las muestras clínicas respecto a los aislamientos bacterianos fue la causa de la menor tasa de positividad de los métodos moleculares aplicados en las muestras clínicas.

Los resultados obtenidos con los métodos de genotipificación aplicados en dos tipos de muestras de la fase septicémica de un mismo paciente, muestra clínica y aislamiento, resultaron totalmente coincidentes para el ARNr 16S (5/5) y parcialmente coincidentes para el MLST (3/4). Si bien estos resultados resultan prometedores, no se pueden generalizar debido a la poca cantidad de pacientes analizados con leptospirosis confirmada por cultivo que también disponían de muestras clínicas de la fase septicémica accesibles. Resulta de gran importancia la realización de estudios que incluyan una mayor cantidad de estos pacientes con leptospirosis confirmada por cultivo y que permitan evaluar la especificidad de estos métodos cuando son aplicados en muestras clínicas.

Tabla 14: Variedades de *Leptospira* spp. identificadas mediante métodos moleculares y serológicos, en pacientes con dos muestras de la fase septicémica de la leptospirosis, suero y aislamiento bacteriano, Argentina, 2005-2016

Aislamientos			Muestras clínicas	
Especie (ARNr 16S)	ST-serogrupo probable (MLST)	Serogrupo (MAT)	Especie (ARNr 16S)	ST-serogrupo probable (MLST)
1 <i>L. interrogans</i>	37-Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	37-Canicola
2 <i>L. interrogans</i>	37-Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	120-Australis
3 <i>L. interrogans</i>	17-Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	17-Icterohaemorrhagiae
4 <i>L. interrogans</i>	37-Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	37-Canicola
5 <i>L. interrogans</i>	17-Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	incompleto
6 <i>L. interrogans</i>	17-Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Negativo	Negativo
7 <i>L. interrogans</i>	37-Canicola	Canicola	Negativo	Negativo
8 <i>L. interrogans</i>	140-Pomona/ Grippotyphosa/ Pyrogenes/ Hebdomadis	Pomona	Negativo	Negativo

10.3.5 Evaluación de ventajas y limitaciones de ARNr 16S y el esquema MLST

En la Tabla 15 se describen los criterios comparativos utilizados para determinar las ventajas y limitaciones de los métodos de tipificación ARNr 16S y MLST.

Tabla 15: Criterios comparativos para ARNr 16S y MLST

Criterio		ARNr 16S	MLST
Tiempo	Preparación de mezcla de reactivos para PCR	20 min	45 min
	Ciclado	49 min	69.5 min
Costo	Reactivos para reacción de PCR	1.06 USD	18.41 USD
	Purificación y secuenciación	20 USD	140 USD
Nivel de resolución taxonómica de <i>Leptospira</i>		género y especie	género, especie y serogrupo
Tasa de tipificación		21.90%	11.40%

Según los criterios evaluados para ambos métodos, el ARNr 16S presenta mayores ventajas que el MLST. Sin embargo, este último método ofrece mayor resolución taxonómica respecto del primero y profundiza la tipificación del género *Leptospira* hasta nivel de serogrupo. Esta información taxonómica resulta epidemiológicamente imprescindible y, hasta el momento, no se puede obtener con otro método aplicable en este tipo de muestras. Para no prescindir de esta información, se propone aplicar ambos métodos en paralelo con la amplificación del gen *rrs* (ARNr 16S) y gen *glmU* (MLST). Con este protocolo sólo se continua con la amplificación de los otros genes del esquema MLST en las muestras que resultaron *glmU* positivas, para minimizar los costos y el tiempo requerido para la ejecución.

10.4 DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESQUEMA SECUENCIAL DE REACCIONES PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DISTINTOS GRUPOS DE ESPECIES DE *Leptospira*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la aplicación de los métodos ARNr 16S y MLST y sus limitaciones, se diseñó un esquema secuencial de 4 reacciones qPCR con el fin de aumentar el número de pacientes con identificación del agente etiológico a partir de muestras de suero y de optimizar recursos humanos y económicos. El desafío implicó diseñar un esquema de tipificación con el menor número de qPCR posibles para identificar todas las variedades de *Leptospira* (no sólo las patógenas, sino también intermedias/patogenicidad desconocida y saprófitas) y, sobre todo, sin necesidad de secuenciación. Las reacciones se basaron en la amplificación del gen *rrs* y se ordenaron para la detección del género *Leptospira* (Reacción A) en primera instancia, luego la de la especie *L. interrogans* (Reacción B) y las últimas dos reacciones para identificar el grupo de especies patógenas (Reacción C) e intermedias (Reacción D).

Se propuso la segunda reacción, para la detección *L. interrogans*, considerando los resultados obtenidos en este estudio. Esta especie resultó ser la identificada con mayor frecuencia en nuestro país durante un período de 12 años por lo que, luego de confirmar el género bacteriano con la primera reacción del esquema, la segunda reacción resolvería la identificación en el 98% de las muestras positivas. En la Figura 13 se describe el esquema secuencial diseñado.

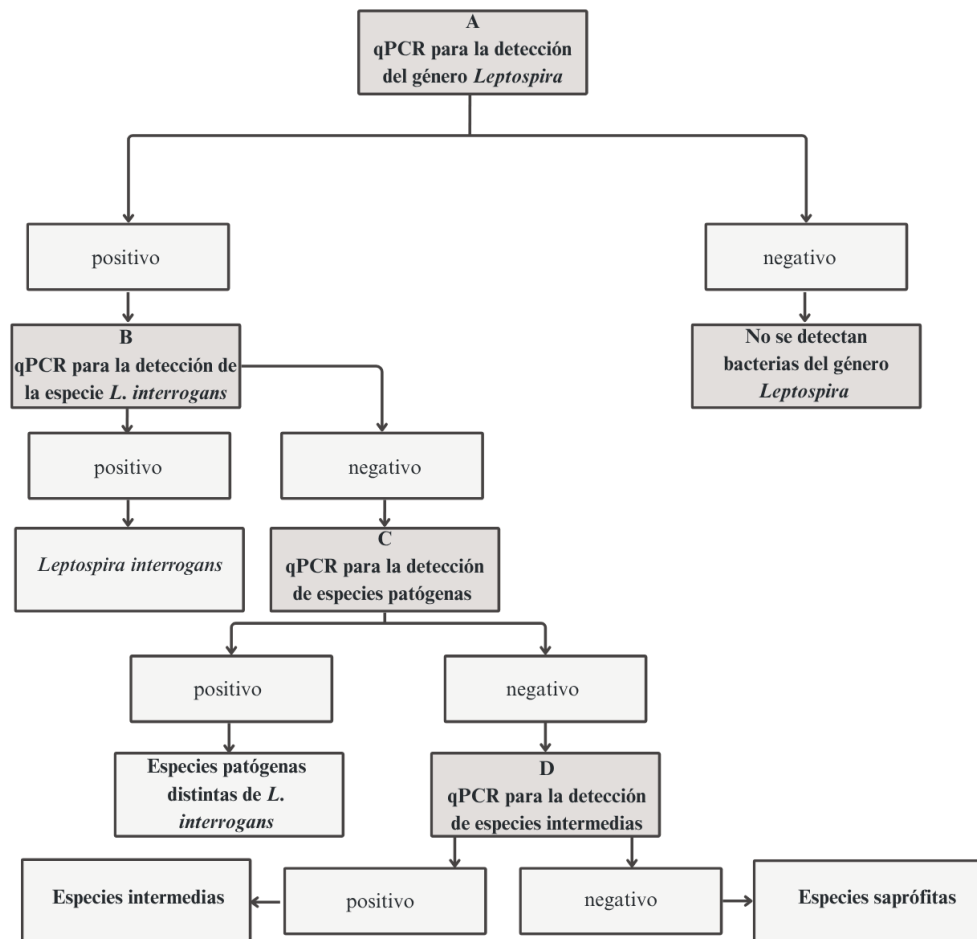


Figura 13: Esquema secuencial de reacciones PCR en tiempo real para la detección de *Leptospira* ssp.

10.4.1 Diseño de los sets de primers y sondas

Se obtuvieron 4 secuencias consenso del gen *rrs*, una para el género *Leptospira*, una para las especies patógenas, una para las de patogenicidad desconocida y otra para *L. interrogans*.

A partir de las secuencias consenso, se diseñaron 5 primers, 1 oligonucleótido con una modificación en el extremo 3' (primer blocker) y 3 sondas de hidrólisis tipo TaqMan específicas para los distintos grupos de especies. En la Tabla 16 se describen estos oligonucleótidos.

Tabla 16: Oligonucleótidos diseñados para la detección *Leptospira* spp.

Oligo-nucleótidos	Secuencia 5'→3'	Longitud	Melting °C	5'	3'
Panlepto-F	CACGAAAGCGTGGGTAGT	18	56	-	-
Panlepto-R	GGCGGTCTACTTAATCCGTTAG	22	66	-	-
Pat/int-F	CGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	23	66	-	-
Pat/int-R	AGATTCTTAACTGCTGCCTCC	21	62	-	-
L.interrogans-F	ACACGTGGGTAATCTTCCTCT	21	62	-	-
No.interrogans-blocker	GTAATCTTCCTYCGAGTCTGG	21	62-64	-	BHQ
Panlepto-P	CCGGTAATCCACGCCCTAAACGT	23	72	FAM	BHQ1
Patógenas-P	CTGAGAGGGTGTTCGGCCACAAT	23	72	FAM	BHQ1
Intermedias-P	CTGAGAGGGTGTCCGGCCACAAT	23	74	HEX	BHQ1

El gen *rrs* es el gen objetivo para todos los oligonucleótidos. F: primer forward, R: primer reverse, P: sonda de hidrólisis; FAM: fluoróforo 6-carboxifluoresceína, BHQ1: black hole quencher 1. Y: base degenerada C/T. Melting °C: temperatura de melting calculada con la fórmula de Wallace, $T_m = 2x(A+T) + 4x(C+G)$.

A continuación, se detallan los oligonucleótidos utilizados en cada reacción:

- A – Detección del género *Leptospira*: primers Panlepto-F y Panlepto-R, sonda Panlepto-P.
- B – Detección de la especie *L. interrogans*: primers *L.interrogans*-F y Pat/int-R, oligonucleótido bloqueador No.interrogans-blocker, sonda Patógenas-P.
- C – Detección de especies patógenas: primers Pat/int-F y Pat/int-R, sonda Patógenas-P.
- D – Detección de especies de patogenicidad desconocida: primers Pat/int-F y Pat/int-R, sonda Intermedias-P

La reacción B para la detección de *L. interrogans* se diseñó como una reacción CAST PCR (del inglés: *Competitive allele-specific TaqMan PCR*), que combina una PCR en tiempo real con el uso de un bloqueador de nucleótidos para suprimir la amplificación de un alelo que no es el alelo objetivo. En este caso, se diseñó un oligonucleótido bloqueador para suprimir la amplificación de los fragmentos del gen *rrs* que no pertenecen a *L. interrogans*.

10.4.2 Determinación de la temperatura óptima de annealing

En las pruebas generales para la determinación de la temperatura óptima de annealing, en las que se ejecutaron reacciones qPCR con extractos de ADN de distintas cepas de *Leptospira* spp. y distintas temperaturas de annealing (56, 62 y 66°C), sólo se obtuvieron los resultados esperados para la Reacción A (detección del género *Leptospira*).

En las Tabla 17 y Tabla 18 se detallan los resultados obtenidos para cada reacción, las temperaturas de annealing y ADN moldes utilizados.

Tabla 17: Prueba general de las reacciones de PCR para la detección del género *Leptospira* y la especie *L. interrogans*

A – PCR para la detección del género <i>Leptospira</i> . Temperatura de annealing 56°C			
ADN molde - <i>Leptospira</i> spp./ml	Ct obtenido	Resultado	
		obtenido	esperado
Control de reactivos	N/A	negativo	negativo
P 1 - 10 ⁸	27.6	positivo	positivo
P 1 - 10 ⁵	23.45	positivo	positivo
S 12 - 10 ⁸	20.63	positivo	positivo
S 12 - 10 ⁵	26.04	positivo	positivo
P 18 - 10 ⁸	18.03	positivo	positivo
P 18 - 10 ⁵	30.01	positivo	positivo
P 2 - 10 ⁵	27.61	positivo	positivo
B – PCR para la detección de la especie <i>L. interrogans</i> Temperatura de annealing 62°C			
Control de reactivos	N/A	negativo	negativo
P 1 - 10 ⁸	27.32	positivo	negativo
P 2 - 10 ⁸	22.77	positivo	positivo
P 3 - 10 ⁸	39.97	positivo	negativo
S 12 - 10 ⁸	37.34	positivo	negativo
P 18 - 10 ⁸	19.88	positivo	negativo
P 1 - 10 ⁵	29.69	positivo	negativo
P 2 - 10 ⁵	26.74	positivo	positivo
P 3 - 10 ⁵	31.27	positivo	negativo
S 12 - 10 ⁵	39.68	positivo	negativo
P 18 - 10 ⁵	29.15	positivo	negativo

N/A: no amplifica, Resultado positivo: Ct menor a 40, Resultado negativo: Ct mayor a 40.

P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, P 3: *L. kirschneri*, P 18: *L. noguchii*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

Tabla 18: Prueba general de las reacciones de PCR para la detección de especies patógenas e Intermedias del género *Leptospira*.

C - PCR para la detección de especies patógenas e intermedias del género <i>Leptospira</i> spp						
Temperatura de annealing: 62°C						
ADN molde - <i>Leptospira</i> spp./ml	Sonda de hidrólisis específica para especies patógenas		Sonda de hidrólisis específica para especies intermedias			
	Ct obtenido	Resultado obtenido	Resultado esperado	Ct obtenido	Resultado obtenido	Resultado esperado
Control de reactivos	N/A	negativo	negativo	N/A	negativo	negativo
P 1 - 10 ⁸	28.38	positivo	positivo	28.52	positivo	negativo
P 1 - 10 ⁷	24.26	positivo	positivo	24.1	positivo	negativo
I b - 10 ⁸	18.91	positivo	negativo	18.53	positivo	positivo
I w - 10 ⁸	23.57	positivo	negativo	23.15	positivo	positivo
P 2 - 10 ⁸	28.57	positivo	positivo	28.62	positivo	negativo
D - PCR para la detección de especies patógenas e intermedias del género <i>Leptospira</i> spp						
Temperatura de annealing: 66°C						
Control de reactivos	N/A	negativo	negativo	N/A	negativo	negativo
P 1 - 10 ⁸	27.69	positivo	positivo	29.16	positivo	negativo
P 1 - 10 ⁷	23.22	positivo	positivo	23.81	positivo	negativo
I b - 10 ⁸	18.5	positivo	negativo	17.27	positivo	positivo
I w - 10 ⁸	23.11	positivo	negativo	24.06	positivo	positivo
P 2 - 10 ⁸	28.06	positivo	positivo	29.82	positivo	negativo
S 12 - 10 ⁸	N/A	negativo	negativo	N/A	negativo	negativo

N/A: no amplifica, Resultado positivo: Ct menor a 40, Resultado negativo: Ct mayor a 40.

P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

El diseño inicial del esquema de tipificación incorporaba una reacción qPCR múltiple para la diferenciación de especies patógenas y de patogenicidad desconocida, es decir, se pretendía reemplazar las reacciones C y D por una reacción qPCR múltiple. Debido a esto, se diseñaron dos sondas de hidrólisis específicas con fluoróforos distintos (sonda patógenas-FAM y sondas intermedias-HEX) que permitan la diferenciación de esas especies. Todos los oligonucleótidos se diseñaron con temperaturas de melting cercanas para poder ser usados en una sola reacción, con una misma temperatura de annealing. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios con las temperaturas ensayadas. Debido a esto, se descartó la opción de la qPCR múltiple y las evaluaciones continuaron para las dos reacciones independientes.

Luego de ejecutar el gradiente de temperatura (55 a 73°C) para la determinación de la temperatura de annealing óptima de la Reacción A (qPCR para la detección de bacterias del género *Leptospira*), se determinó que 63.7°C podría ser la temperatura de annealing adecuada para la diferenciación de cepas de este género. En la Tabla 19 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 19: Gradiente de temperaturas, qPCR para la detección de bacterias del género *Leptospira* (Reacción A)

Gradiente °C	Control de reactivos	ADN de cepas						
		S 12	P 2	P 1	I w	I b	Eco	Sau
73	N/A	N/A	39.96	-	-	-	-	-
72	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-
70	N/A	27.36	30.78	-	-	32.25	-	-
66.4	N/A	23.88	26.39	-	-	23.24	-	-
62	N/A	23.59	26.03	-	-	22.64	-	-
58.6	N/A	23.47	25.92	-	-	22.61	-	-
56.2	N/A	23.64	26.09	-	-	23.05	-	-
55	N/A	24.03	26.26	-	-	23.18	-	-
73	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
72.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
71.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
69.4	N/A	26.39	17.94	18.02	28.92	26.65	N/A	N/A
67	N/A	18.21	15.45	15.34	22.29	21.14	N/A	N/A
65	N/A	17.59	15.02	14.99	21.63	19.93	N/A	38.45
63.7	N/A	17.15	15.03	15.02	21.44	19.46	N/A	N/A
63	N/A	17.37	15.22	15.21	21.39	19.85	38.51	N/A

N/A: no amplifica. Eco: cepa ATCC de *Escherichia coli*, Sau: cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*.

P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

Por otro lado, se determinó que 67°C fue la temperatura de annealing óptima para la Reacción B (qPCR que detecta a la especie *L. interrogans*), siempre que se establezca un Ct de corte que permita la diferenciación de especies. El gradiente ensayado abarcó temperaturas de annealing de 58 a 76°C. En la Tabla 20 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 20: Gradiente de temperaturas, qPCR para la detección de la especie *L. interrogans* (Reacción B).

Gradiente °c	Control	ADN de cepas						
	de reactivos	P 2	P 1	P 3	P 18	S 12	I w	I b
76	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
75.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
73.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
70.9	N/A	N/A	N/A	N/A	7,8*	N/A	N/A	-
67.5	N/A	28.82	35.33	33.46	38.74	N/A	N/A	-
64.8	N/A	27.23	27.15	26.32	27.05	N/A	33.03	-
63	N/A	23.8	26.07	24.96	24.05	39.64	31.67	-
62	N/A	24.12	25.76	25.05	24.16	N/A	30.83	-
70	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-
69.9	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-
69.5	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-
68.9	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-
68.2	N/A	28.82	35.33	-	-	-	-	-
67.6	N/A	27.23	27.15	-	-	-	-	-
67.2	N/A	23.8	26.07	-	-	-	-	-
67	N/A	24.12	25.76	-	-	-	-	-
69.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
69.4	N/A	N/A	N/A	N/A	19,92	N/A	N/A	N/A
69.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	13,5	N/A	N/A
68.8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
68.4	N/A	35.48	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
68	N/A	25.94	34.63	36	N/A	N/A	N/A	14.2
67.7	N/A	23.83	29.38	35.45	N/A	N/A	N/A	25.08
67.6	N/A	23.02	35.48	36.01	N/A	N/A	N/A	35.96
67	N/A	24.04	36.42	37.63	-	-	-	-
66,5	N/A	22.32	27.18	35.10	-	-	-	-
65,5	N/A	19.19	23.89	26.26	-	-	-	-
63,7	N/A	18.18	21.10	23.02	-	-	-	-
61,6	N/A	17.18	18.58	21.06	-	-	-	-
59,8	N/A	18.23	17.77	21.20	-	-	-	-
58,6	N/A	16.73	19.67	20.96	-	-	-	-
58	N/A	18.36	19	20.68	-	-	-	-

N/A: no amplifica. P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, P 3: *L. kirschneri*, P 18: *L. noguchii*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

Para la Reacción C (qPCR que detecta especies patógenas del género *Leptospira*), se determinó

que 69,1°C podría ser la temperatura de annealing adecuada, siempre que se establezca un Ct de corte que permita la diferenciación de estas especies. El gradiente ensayado abarcó temperaturas de 62 a 76°C. En la Tabla 21 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 21: Gradiente de temperaturas, qPCR para la detección de especies patógenas del género *Leptospira* (Reacción C)

Gradiente °C	Control de reactivos	ADN de cepas						
		P 2	S 12	I w	I b	P 1	P 3	P 18
76	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
75.2	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
73.7	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
70.9	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
67.5	N/A	26.37	N/A	29.98	-	-	-	-
64.8	N/A	28.35	N/A	29.68	-	-	-	-
63	N/A	25.42	26.99	29.81	-	-	-	-
62	N/A	25.38	26.33	29.96	-	-	-	-
72	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
71.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
71.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
70.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
69	N/A	30.25	N/A	31.39	N/A	-	-	-
68	N/A	22.05	N/A	22.89	25.38	-	-	-
67.4	N/A	20.87	N/A	21.94	21.99	-	-	-
67	N/A	20.4	N/A	21.92	21.75	-	-	-
70.2	N/A	37.81	27.85	N/A	N/A	N/A	N/A	39.61
70.1	N/A	N/A	N/A	N/A	19.79	5	N/A	N/A
70	N/A	N/A	37.93	N/A	N/A	5.85	N/A	38.59
69.8	N/A	27.5	37.94	N/A	39.58	37.22	38.59	7.68
69.5	N/A	36.8	N/A	37.31	37.27	24.66	34.7	37.39
69.3	N/A	27.17	N/A	36.55	36.46	22.29	21.97	34.16
69.1	N/A	26.35	N/A	37.57	35.39	19.96	20.69	25.97
69	N/A	24.5	N/A	N/A	28.54	20.38	19.49	34.54

N/A: no amplifica. P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, P 3: *L. kirschneri*, P 18: *L. noguchii*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

Finalmente, se determinó que 69°C podría ser la temperatura de annealing adecuada para la Reacción D que detecta especies de patogenicidad desconocida, siempre que se establezca un Ct de corte que permita la diferenciación de estas especies. El gradiente ensayado abarcó temperaturas de 62 a 76°C. En la Tabla 22 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 22: Gradiente de temperaturas, qPCR para la detección de especies intermedias del género *Leptospira* (Reacción D).

Gradiente °C	Control de reactivos	ADN de cepas						
		P 2	S 12	I w	I b	P 1	P 18	P 3
76	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
75.2	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
73.7	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
70.9	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-
67.5	N/A	28.92	N/A	34.16	-	-	-	-
64.8	N/A	25.1	N/A	29.38	-	-	-	-
63	N/A	24.79	27.51	29.23	-	-	-	-
62	N/A	25.19	26.42	29.26	-	-	-	-
72	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
71.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
71.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
70.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-
69	N/A	37.53	N/A	39.03	23.01	-	-	-
68	N/A	23.74	N/A	35.52	19.9	-	-	-
67.4	N/A	21.4	N/A	24.92	18.73	-	-	-
67	N/A	21.94	N/A	21.58	18.78	-	-	-
70.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
70.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
69.8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	39.03	37.93	N/A
69.5	N/A	32.97	N/A	N/A	29.47	37.15	32.51	N/A
69.3	N/A	28.46	N/A	N/A	23.29	36.63	36.75	36.56
69.1	N/A	26.47	N/A	39.58	22.94	36.05	35.75	35.15
69	N/A	36.62	N/A	39.39	22.94	36.37	36.42	37.19

N/A: no amplifica. P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, P 3: *L. kirschneri*, P 18: *L. noguchii*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

10.4.3 Determinación de las condiciones óptimas de reacción

En la Tabla 23 se detallan los valores duplicados de Cts, obtenidos en los experimentos realizados para la optimización de cada reacción de amplificación del esquema secuencial siguiendo la matriz ortogonal del Método Taguchi (Tabla 8). Se registraron los valores de Cts duplicados obtenidos en los 9 experimentos que se realizaron para cada qPCR diseñada (A, B, C, D). En estos experimentos se combinaron tres niveles de las variables estudiadas y las temperaturas de annealing determinadas en el punto anterior (63.7°C para los experimentos de la qPCR A, 67°C para los de la qPCR B, 69.1°C para los de la qPCR C y 69°C para los de la qPCR D).

Tabla 23: Valores de Cts de los ensayos duplicados (Ct1 y Ct2) para todos los experimentos y sus correspondientes relaciones señal-ruido

Experimento	A: detección del género <i>Leptospira</i>				B: detección de <i>L. interrogans</i>			
	Ct1	Ct2	media Ct	Rel S/N	Ct1	Ct2	media Ct	Rel S/N
1	16.7	14.32	15.5	-23.84	24.21	21.42	22.8	-27.18
2	13.8	13.05	13.4	-22.56	34.39	33.7	34.0	-30.64
3	13.03	10.09	11.6	-21.33	37.27	33.84	35.6	-31.03
4	14.36	13.34	13.9	-22.83	16.08	12.19	14.1	-23.09
5	13.3	12.66	13.0	-22.27	16.53	16.9	16.7	-24.46
6	14.79	13.51	14.2	-23.02	14.85	15.28	15.1	-23.56
7	13.27	12.12	12.7	-22.08	14.56	13.67	14.1	-23.00
8	14.52	13.38	14.0	-22.90	13.19	12.08	12.6	-22.04
9	13.35	12.93	13.1	-22.37	13.48	13.63	13.6	-22.64

Experimento	C: detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> spp.				D: detección de especies intermedias de <i>Leptospira</i> spp.			
	Ct1	Ct2	media Ct	Rel S/N	Ct1	Ct2	media Ct	Rel S/N
1	34.72	120	77.4	-38.92	120	120	120.0	-41.58
2	38.15	120	79.1	-38.99	120	120	120.0	-41.58
3	36.01	38.36	37.2	-31.41	120	120	120.0	-41.58
4	39.46	120	79.7	-39.02	21.58	26.29	23.9	-27.62
5	34.65	37.07	35.9	-31.10	23.45	34.23	28.8	-29.35
6	34.64	36.89	35.8	-31.07	17.42	17.53	17.5	-24.85
7	19.7	25.74	22.7	-27.20	18.47	18.11	18.3	-25.24
8	23.07	25.49	24.3	-27.72	15.35	14.22	14.8	-23.40
9	19.34	22.7	21.0	-26.48	16.53	15.45	16.0	-24.08

Debido a que cada nivel (A, B y C) de las variables estudiadas se repite 3 veces en la matriz, se calculó el promedio de las relaciones S/N de cada nivel. Se consideró que el nivel óptimo de cada variable fue el que resultó con el valor promedio S/N más alto:

- Reacción A (qPCR para la detección del género *Leptospira*): el nivel 3 resultó óptimo para las tres variables estudiadas, correspondiendo a 75ng de ADN molde, 500nM de primers y de sonda.
- Reacción B (qPCR para la detección de *L. interrogans*): resultaron óptimos los niveles 1 de las variables concentración de sonda (100nM), oligonucleótido blocker (100nM) y concentración de ADN molde (25ng); y el nivel 3 de la variable concentración de primer (500nM).
- Reacción C (qPCR para la detección de especies patógenas del género *Leptospira*): el nivel 3 resultó óptimo para las tres variables estudiadas, correspondiendo a 75ng de ADN molde, 500nM de primers y de sonda.
- Reacción D (qPCR para la detección de especies intermedias del género *Leptospira*):

resultaron óptimos los niveles 1 de concentración de ADN molde (25ng); y los niveles 3 de las variables concentración de primer y de sonda (500nM).

Estos resultados se describen en la Tabla 24.

Tabla 24: Promedio de las relaciones señal-ruido para cada nivel de las variables estudiadas en las cuatro reacciones del esquema secuencial y determinación del nivel óptimo de cada variable.

Reacción	Variable	Valores promedio S/N por nivel			Óptimo
		A	B	C	
A: detección del género <i>Leptospira</i>	Primers	-22.58	-22.71	-22.45	3
	Sonda	-22.92	-22.58	-22.24	3
	ADN	-23.25	-22.59	-21.89	3
B: detección de <i>L. interrogans</i>	Primers	-29.62	-23.70	-22.56	3
	Sonda	-24.42	-25.71	-25.74	1
	Blocker	-24.26	-25.46	-26.16	1
	ADN	-24.76	-25.73	-25.39	1
C: detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> spp.	Primers	-36.44	-33.73	-27.13	3
	Sonda	-35.05	-32.60	-29.66	3
	ADN	-32.57	-34.83	-29.90	3
D: detección de especies intermedias de <i>Leptospira</i> spp.	Primers	-41.58	-27.27	-24.24	3
	Sonda	-31.48	-31.45	-30.17	3
	ADN	-29.94	-31.10	-32.06	1

Los valores promedios más altos se muestran en negrita y los niveles óptimos se muestran en la columna "Óptimo".

En la Tabla 25 se describen los protocolos optimizados establecidos para las cuatro qPCR del esquema secuencial.

Tabla 25: Protocolos para las reacciones de amplificación qPCR de distintas regiones del gen *rrs* para la identificación de género y grupos de especies de *Leptospira*, y secuencias de los primers utilizados.

	A: detección del género <i>Leptospira</i>	B: detección de <i>L. interrogans</i>
Secuencia 5'→3'	panlepto-F	L.interrogans-F
Primer F	CACGAAAGCGTGGGTAGT	ACACGTGGGTAATCTTCCTCT
Secuencia 5'→3'	panlepto-R	pat/int-R
Primer R	GGCGGTCTACTTAATCCGTTAG	AGATTCTTAACTGCTGCCTCC
Secuencia 5'→3'		No.interrogans-blocker
oligonucleótido bloqueador	NC	GTAATCTTCCTYCGAGTCTGG- BHQ
Secuencia 5'→3'	panlepto-P (FAM-BHQ1)	patógenas-P (FAM-BHQ1)
sonda hidrólisis	CCGGTAATCCACGCCCTAAACGT	CTGAGAGGGTGTTCCGCCACAAT
Concentración primers (nM)	500	500
Concentración sonda de hidrólisis (nM)	500	100
Concentración oligonucleótido bloqueador (nM)	NC	100
Concentración ADN molde (ng)	75	25
Temperatura de annealing (°C)	63.7	67
	C: detección de especies patógenas de <i>Leptospira</i> spp.	D: detección de especies intermedias de <i>Leptospira</i> spp.
Secuencia 5'→3'	pat/int-F	primers pat/int-F
Primer F	CGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	CGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
Secuencia 5'→3'	pat/int-R	pat/int-R
Primer R	AGATTCTTAACTGCTGCCTCC	AGATTCTTAACTGCTGCCTCC
Secuencia 5'→3'		
oligonucleótido bloqueador	NC	NC
Secuencia 5'→3'	patógenas-P (FAM-BHQ1)	intermedias-P (HEX-BHQ1)
sonda hidrólisis	CTGAGAGGGTGTTCCGCCACAAT	CTGAGAGGGTGTTCCGCCACAAT
Concentración primers (nM)	500	500
Concentración sonda de hidrólisis (nM)	500	500
Concentración oligonucleótido bloqueador (nM)	NC	NC
Concentración ADN molde (ng)	75	25
Temperatura de annealing (°C)	69.1	69
1X de IQ TM supermix (Bio Rad Laboratories, California, EEUU).		
Ciclado: 2min a 50°C, 10min a 95°C, 40 ciclos de 15seg a 95°C, 1min a Temperatura de annealing óptima para cada reacción.		

F: primer forward, R: primer reverse, FAM: fluoróforo 6-carboxifluoresceína, BHQ1: black hole quencher
1. Y: base degenerada C/T. NC: no corresponde.

En la Tabla 26 se detallan los resultados obtenidos en los experimentos ejecutados para verificar los niveles óptimos establecidos que maximizaron la relación S/N y minimizaron los valores Cts en cada una de las reacciones del esquema secuencial.

Tabla 26: Resultados preliminares de cada reacción qPCR del esquema secuencial con las condiciones óptimas de reacción.

ADN molde	Valores de Ct			
	A detección género <i>Leptospira</i>	B detección <i>L. interrogans</i>	C detección especies patógenas	D detección especies intermedias
Control de reactivos	N/A	37.94	N/A	33.19
P 2	11.67	15.48	33.28	32.35
P 1	10.08	22.02	16.05	31.69
P 3	-	37.59	N/A	32.34
P 18	9.99	22.80	14.87	11.73
S 12	12.94	39.80	N/A	30.52
I w	9.56	22.41	20.07	31.66
I b	10.83	25.36	23.00	15.19
Pae	32.85	35.45	N/A	8.37
Eco	35.69	39.49	10.73	34.37

N/A: no amplifica. P 1: *L. borgpetersenii*, P 2: *L. interrogans*, P 3: *L. kirschneri*, P 18: *L. noguchii*, S 12: *L. biflexa*, I b: *L. broomii*, I w: *L. wolffii*; donde P hace referencia a especies patógenas, S a especies saprófitas e I a especies de patogenicidad desconocida.

Según estos resultados, las dos primeras reacciones del ensayo secuencial permitirían la identificación de bacterias del género *Leptospira* y de la especie *L. interrogans*, estableciendo previamente un Ct de corte que permita la correcta diferenciación con otras especies. Sin embargo, resulta necesario continuar con ensayos de validación analítica y diagnóstica.

Por otro lado, los ensayos de las qPCR para la detección de especies patógenas e intermedias no resultaron según lo esperado. En ambos casos, sería conveniente continuar con los ensayos de evaluación preliminar.

11 CONCLUSIONES

Comprender la epidemiología y la patogénesis de la leptospirosis, así como proponer nuevas herramientas que permitan abordar el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad, requieren de un conocimiento detallado de las variedades del género *Leptospira* que circulan en las regiones endémicas. Tradicionalmente, la información de las especies y serogrupos causantes de enfermedad surge de la identificación de los aislamientos bacterianos recuperados de pacientes enfermos. Por lo que esta información es escasa en contextos donde el cultivo de *Leptospira* spp. es limitado o inviable.

En este estudio se evaluó el desempeño de dos métodos de tipificación basados en la tecnología de secuenciación e independientes del cultivo bacteriano, el ARNr 16S y MLST, cuando son aplicados en muestras de suero. Este es el tipo de muestra solicitada de rutina para el diagnóstico de leptospirosis. Luego de establecer un protocolo para optimizar recursos y ampliar las posibilidades de tipificación, el ARNr 16S y MLST optimizados permitieron identificar el agente etiológico en el 21,9% y 11,4 % de los pacientes estudiados, respectivamente. El grado de acuerdo entre los resultados positivos y negativos fue moderado. Estos resultados son aceptables en el contexto del estudio, en el que no se utilizaron técnicas moleculares de tamizaje.

Dos especies de *Leptospira* resultaron ser las responsables de los casos de leptospirosis tipificados en este estudio y *L. interrogans* fue la especie identificada con mayor frecuencia. La clasificación taxonómica se profundizó mediante MLST, se detectaron diferentes genotipos que correspondieron a las mismas especies identificadas mediante ARNr 16S y a 8 serogrupos diferentes. La aplicación de los métodos permitió identificar especies y serogrupos de *Leptospira* spp. que causaron enfermedad en Argentina, durante un período de 12 años.

Se observó que el 71.15% de los casos tipificados provenían de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, las dos provincias que históricamente concentran el mayor número de casos de leptospirosis. No se pudieron establecer patrones de distribución geográfica según las distintas especies y serogrupos identificados, posiblemente debido a la falta de diversidad de especies identificadas y la baja cantidad de muestras con tipificación del serogrupo probable. La ubicación geográfica de las variedades de *Leptospira* identificadas permitiría relacionarlas con los posibles reservorios para establecer medidas de prevención y control adecuadas. Es por esto que resulta relevante realizar nuevos estudios epidemiológicos para aportar un número significativo de datos que permitan determinar patrones de distribución geográfica predecibles para estos dos niveles taxonómicos.

Por otro lado, se identificaron las mismas variedades de *Leptospira* spp. en los aislamientos y muestras clínicas de fase septicémica de pacientes con leptospirosis confirmada por cultivo, excepto en el serogrupo de un caso. Estos hallazgos indican que ambos métodos son efectivos al aplicarlos en muestras clínicas. Sin embargo, para poder generalizar los resultados, es imprescindible analizar un mayor número de casos de leptospirosis con aislamiento bacteriano y

muestras de suero de la fase septicémica.

El método ARNr 16S presenta mayores ventajas que el MLST considerando las tasas de tipificación, costo y tiempo de ejecución, pero el último método ofrece una mayor resolución taxonómica. Además de confirmar la especie identificada por ARN 16S, el MLST profundiza la tipificación a nivel de serogrupo. Esta información taxonómica resulta epidemiológicamente imprescindible y, hasta el momento, no se puede obtener con otro método aplicable en muestras de suero. Para acceder a esta información usando los insumos de laboratorio de manera eficiente y acelerando las etapas de ejecución, se propuso la amplificación en paralelo de los genes *rrs* (ARNr 16S) y *glmU* (MLST). Sólo en las muestras *glmU* positivas se amplificaron los demás genes del esquema MLST.

Ambos métodos de genotipificación resultaron herramientas útiles para incrementar el conocimiento de las variedades de *Leptospira* spp. que causaron enfermedad en nuestro país, superando las limitaciones del aislamiento bacteriano y reemplazando la información imprecisa obtenida del diagnóstico serológico. El conocimiento de las especies y serogrupos permite optimizar los métodos diagnósticos y adecuar el panel de antígenos utilizado en la técnica de referencia, para lograr un diagnóstico oportuno y de calidad. También permite desarrollar estrategias de prevención y control adecuadas para la población objetivo.

Considerando los resultados anteriores se diseñó un esquema secuencial de reacciones PCR en tiempo real independientes, basado en la amplificación de distintas regiones del gen *rrs* para la identificación del género *Leptospira*, luego de *L. interrogans* y, por último, especies patógenas e intermedias. Las reacciones se ordenaron con el fin de aumentar el número de casos con identificación del agente etiológico, agilizar la identificación bacteriana y optimizar recursos. De esta manera, la ejecución de la primera y segunda reacción permitiría resolver la identificación bacteriana en el 98% de las muestras positivas. Los resultados obtenidos luego de la optimización de las reacciones de identificación de género y *L. interrogans* fueron satisfactorios. Sin embargo, las combinaciones de variables evaluadas para las reacciones diseñadas para identificación de especies patógenas e intermedias no resultaron óptimas. El esquema secuencial de reacciones en tiempo real promete ser una herramienta útil para la identificación de los distintos grupos de especies del género *Leptospira*. Presenta la ventaja de no requerir de la tecnología de secuenciación y ser fácilmente adaptable a distintos escenarios epidemiológicos y demandas diagnósticas. El orden de las reacciones se puede alterar según el origen de la muestra biológica y la patogenicidad de la especie que se espera encontrar. También, si surgen modificaciones en la frecuencia de las especies identificadas en una región o, en el caso de requerir la tipificación preliminar para continuar con los métodos basados en secuenciación. Sin embargo, los ensayos de validación de todo el esquema deben profundizarse.

Los métodos de genotipificación ARNr 16S y MLST, y el esquema de reacciones qPCR diseñado, se proponen como herramientas útiles para la identificación precisa del agente etiológico de

leptospirosis a partir de muestras de suero. En conjunto, los hallazgos de esta tesis contribuyen a fortalecer el conocimiento de las variedades de *Leptospira* spp. que causan enfermedad en Argentina y proporcionan herramientas útiles para la vigilancia epidemiológica y la toma de decisiones en salud pública.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Koizumi, N., & Nakamura, S. (2023). Machine learning-based motion tracking reveals an inverse correlation between adhesivity and surface motility of the leptospirosis spirochete. *Nature Communications*, 14(1), 7703. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43366-0>
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Agampodi, S. B., Dahanayaka, N. J., Bandaranayaka, A. K., Perera, M., Priyankara, S., Weerawansa, P., Matthias, M. A., & Vinetz, J. M. (2014). Regional Differences of Leptospirosis in Sri Lanka: Observations from a Flood-Associated Outbreak in 2011. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2626. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002626>
- Agampodi, S. B., Moreno, A. C., Vinetz, J. M., & Matthias, M. A. (2013). Utility and limitations of direct multi-locus sequence typing on qPCR-positive blood to determine infecting *Leptospira* strain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 184-185. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0526>
- Agampodi, S. B., Peacock, S. J., Thevanesam, V., Nuggeoda, D. B., Smythe, L., Thaipadungpanit, J., Craig, S. B., Burns, M. A., Dohnt, M., Boonsilp, S., Senaratne, T., Kumara, A., Paliyawadana, P., Perera, S., & Vinetz, J. M. (2011). Leptospirosis Outbreak in Sri Lanka in 2008: Lessons for Assessing the Global Burden of Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3), 471-478. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0276>
- Agampodi, S. B., & Vinetz, J. M. (2021). Next-Generation Sequencing Analysis of Pathogenic *Leptospira*: A Way Forward for Understanding Infectious Disease Dynamics in Low/Middle-Income, Disease-Endemic Settings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, tpmd201518. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1518>
- Ahmad, S. N., Shah, S., & Ahmad, F. M. (2005). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3), 195-200.

- Ahmed, A., & P. Grobusch, M. (2012). Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000133>
- Ahmed, N., Devi, S. M., Valverde, M. de los Á., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
- Aranzazu Ceballos, A. D., Apraez Henao, L., & Ortiz Marín, D. C. (2020). [Leptospirosis in pediatrics, a diagnosis to be considered]. *Revista Chilena De Infectologia: Organo Oficial De La Sociedad Chilena De Infectologia*, 37(6), 728-738. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182020000600728>
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., & Kotula-Balak, M. (2022). *Leptospira* taxonomy: Then and now. *Medycyna Weterynaryjna*, 78. <https://doi.org/10.21521/mw.6694>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D36-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bertasio, C., Papetti, A., Scaltriti, E., Tagliabue, S., D'Incau, M., & Boniotti, M. B. (2020). Serological Survey and Molecular Typing Reveal New *Leptospira* Serogroup Pomona Strains among Pigs of Northern Italy. *Pathogens*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens9050332>
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757-771. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
- Bio-Rad Laboratories. (2006). *Real Time PCR – Applications Guide*.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M. S., Holden, M. T. G., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A. R., Craig, S., Smythe, L. D., Hartskeerl, R. A., Day, N. P., Chantratita, N., Feil, E. J., Aanensen, D.

- M., ... Peacock, S. J. (2013a). A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M. S., Holden, M. T. G., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A. R., Craig, S., Smythe, L. D., Hartskeerl, R. A., Day, N. P., Chantratita, N., Feil, E. J., Aanensen, D. M., ... Peacock, S. J. (2013b). A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2011). Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira*spp. In blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases*, 11(1), 338. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-338>
- Bradley, E. A., & Lockaby, G. (2023). Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1167. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091167>
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009a). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009b). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(5), 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Chacko, C. S., Lakshmi S, S., Jayakumar, A., Binu, S. L., Pant, R. D., Giri, A., Chand, S., & Up, N. (2021). A short review on leptospirosis: Clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 11, 100741. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2021.100741>
- Chiani, Y., Jacob, P., Varni, V., Landolt, N., Schmeling, M. F., Pujato, N., Caimi, K., & Vanasco, B. (2016). Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina.

- Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 37, 245-251.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033>
- Chiani, Y. T., Jacob, P., Mayora, G., Aquino, D. S., Quintana, R. D., & Mesa, L. (2023). Presence of *Leptospira* spp. In a Mosaic of Wetlands Used for Livestock Raising under Differing Hydroclimatic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(6), e0197122.
<https://doi.org/10.1128/aem.01971-22>
- Cobb, B. D., & Clarkson, J. M. (1994). A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, 22(18), 3801-3805.
- Colombo, V. C., Gamietea, I., Loffler, S. G., Brihuega, B. F., & Beldomenico, P. M. (2018). New host species for *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Veterinary Microbiology*, 215, 90-92.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.007>
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., & Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003898.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Cristaldi, M. A., Catry, T., Pottier, A., Herbreteau, V., Roux, E., Jacob, P., & Previtali, M. A. (2022). Determining the spatial distribution of environmental and socio-economic suitability for human leptospirosis in the face of limited epidemiological data. *Infectious Diseases of Poverty*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-01010-x>
- Cudós, M. C., Landolt, N., Jacob, P., Schmeling, M. F., Chiani, Y., Brazza, S., Gómez Celora, A., Anchart, E., Uboldi, M. A., & Vanasco, N. B. (2014). Vigilancia intensificada de leptospirosis en Santa Fe y Entre Ríos (2012-2013). *Revista Argentina de Salud Pública*, 5(18), 24-30.
- Epidat, P. para análisis epidemiológico de datos. V. 4. 2. (2016). [Software] (Versión Versión 4.2). Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de

- la Salud (OPS-OMS); Universidad CES, Colombia. <http://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>
- Fernandes, L. G. V., Stone, N. E., Roe, C. C., Goris, M. G. A., van der Linden, H., Sahl, J. W., Wagner, D. M., & Nally, J. E. (2022). *Leptospira sanjuanensis* sp. Nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from soil in Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(10), 005560. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005560>
- Ferreira, A. S., Ahmed, A., Rocha, T., Vieira, M. L., Paiva-Cardoso, M. das N., Mesquita, J. R., Linden, H., Goris, M., Thompson, G., Hartskeerl, R. A., & Inácio, J. (2020). Genetic diversity of pathogenic leptospires from wild, domestic and captive host species in Portugal. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), 852-864. <https://doi.org/10.1111/tbed.13409>
- Galan, D. I., Schneider, M. C., & Roess, A. A. (2023). Leptospirosis Risk among Occupational Groups in Brazil, 2010-2015. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(2), 376-386. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0181>
- Garcia-Lopez, M., Lioroux, C., Soares, A., Trombert-Paolantoni, S., Harran, E., Ayrat, F., Picardeau, M., Djelouadji, Z., & Bourhy, P. (2023). Genetic diversity of *Leptospira* strains circulating in humans and dogs in France in 2019-2021. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1236866>
- Goarant, C. (2016). Leptospirosis: Risk factors and management challenges in developing countries. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 7, 49-62. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S102543>
- Goarant, C., Picardeau, M., Morand, S., & McIntyre, K. M. (2018). Leptospirosis under the bibliometrics radar: Evidence for a vicious circle of neglect. *Journal of Global Health*, 9(1), 010302. <https://doi.org/10.7189/jogh.09.010302>
- Goris, M., Leeflang, M., Boer, K., Goeijenbier, M., van Gorp, E., Wagenaar, J., & Hartskeerl, R. (2011). Establishment of Valid Laboratory Case Definition for Human Leptospirosis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 3(2). <https://doi.org/10.4172/2155->

- Guernier, V., Allan, K. J., & Goarant, C. (2018). Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology*, 145(5), 595-607. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001147>
- Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., Jaffar-Bandjee, M.-C., Michault, A., Tortosa, P., & Dellagi, K. (2016). Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004733>
- Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekatte, O., Zinini, F., Brisse, S., & Picardeau, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>
- Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in Humans. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 65-97). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41), 95-98. <https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>
- Hamond, C., Tibbs-Cortes, B., Fernandes, L. G. V., LeCount, K., Putz, E. J., Anderson, T., Camp, P., Stuber, T., Hicks, J., van der Linden, H., dos Santos Ribeiro, P., Bayles, D. O., Schlater, L. K., & Nally, J. E. (2025). *Leptospira gorisiae* sp. nov, *L. cinconiae* sp. nov, *L. mgodei* sp. nov, *L. milleri* sp. nov and *L. iowaensis* sp. nov: Five new species isolated from water sources in the Midwestern United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 75(1), 006595. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006595>
- INBIO HIGHWAY Biología Molecular. (2024). Protocolo para bacterias Gram negativas y Protocolo para bacterias Gram positivas. En *Highway ADN PuriPrep-B kit* (pp. 11-13).
- Jacob, P., Schmeling, M. F., Chiani, Y. T., Landolt, N. Y., Scialfa, E., Fusco, S., & Vanasco, B. (2015). Evaluación de un panel reducido de cepas de leptospirosis para el diagnóstico en humanos por microaglutinación (MAT). *Salud Pública de México*, 57(5), 419-425.

- Karpagam, K. B., & Ganesh, B. (2020). Leptospirosis: A neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(5), 835-846. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03797-4>
- Kmety, E., & Dikken, H. (1993). *Classification of the species Leptospira interrogans and history of its serovars*. University Press Groningen.
- Koizumi, N., & Picardeau, M. (Eds.). (2020). *Leptospira spp.: Methods and Protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5>
- Korba, A. A., Lounici, H., Kainiu, M., Vincent, A. T., Mariet, J.-F., Veyrier, F. J., Goarant, C., & Picardeau, M. (2021). *Leptospira ainlahdjerensis* sp. Nov., *Leptospira ainazelensis* sp. Nov., *Leptospira abararensis* sp. Nov. And *Leptospira chreensis* sp. Nov., four new species isolated from water sources in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(12), 005148. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005148>
- Landolt, N. Y., Chiani, Y. T., Pujato, N., Jacob, P., Schmeling, M. F., García Effron, G., & Vanasco, N. B. (2023). Utility evaluation of two molecular methods for *Leptospira* spp. Typing in human serum samples. *Heliyon*, 9(2), e12564. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12564>
- Leon, A., Pronost, S., Fortier, G., Andre-Fontaine, G., & Leclercq, R. (2010). Multilocus Sequence Analysis for Typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 581-585. <https://doi.org/10.1128/JCM.00543-09>
- Levett, P. N. (2001a). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P. N. (2001b). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P. N. (2003a). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(4), 447-452. <https://doi.org/10.1086/346208>

- Levett, P. N. (2003b). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(4), 447-452. <https://doi.org/10.1086/346208>
- Li, D., Liang, H., Yi, R., Xiao, Q., Zhu, Y., Chang, Q., Zhou, L., Liu, B., He, J., Liu, T., Fan, Z., Cheng, W., Wang, W., Zhang, Y., & Pan, P. (2022). Clinical characteristics and prognosis of patient with leptospirosis: A multicenter retrospective analysis in south of China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1014530>
- Loffler, S. G., Pavan, M. E., Vanasco, B., Samartino, L., Suarez, O., Auteri, C., Romero, G., Brihuega, B., Loffler, S. G., Pavan, M. E., Vanasco, B., Samartino, L., Suarez, O., Auteri, C., Romero, G., & Brihuega, B. (2014). Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 163-167. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140295>
- López, M. S., Müller, G. V., Lovino, M. A., Gómez, A. A., Sione, W. F., & Aragonés Pomares, L. (2019). Spatio-temporal analysis of leptospirosis incidence and its relationship with hydroclimatic indicators in northeastern Argentina. *Science of The Total Environment*, 694, 133651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133651>
- Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., & Picardeau, M. (2005). Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 539-545. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005>
- Mendoza, M. V., & Rivera, W. L. (2021). Application of simplified MLST scheme for direct typing of clinical samples from human leptospirosis cases in a tertiary hospital in the Philippines. *PloS One*, 16(10), e0258891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258891>
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Girons, I. S. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2219-2224.

- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2219-2224.
- Merien, F., Baranton, G., & Perolat, P. (1995). Comparison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination Test and Culture for Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 172(1), 281-285. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.1.281>
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., & Baranton, G. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011>
- Ministerio de Salud Nación. (2014). *Enfermedades infecciosas: Leptospirosis. Guía para el equipo de salud*. 50.
- Morero, M., Ramirez, M. R., & Oyhenart, J. (2021). Taguchi method for the optimization of three loop mediated isothermal amplification procedures for *Trichomonas foetus* detection. *Veterinary Parasitology*, 295, 109462. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109462>
- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., & Levett, P. N. (2006). Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3510-3516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06>
- Musso, D., & La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 46(4), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001>
- Nakamura, S. (2022). Motility of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*: Insight into Association with Pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1859. <https://doi.org/10.3390/ijms23031859>
- Perez, J., & Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*, 10(1), 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>

- Petakh, P., Oksenysh, V., & Kamyshnyi, O. (2024). Corticosteroid Treatment for Leptospirosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(15), 4310. <https://doi.org/10.3390/jcm13154310>
- Pham, H. T., & Tran, M.-H. (2022). One Health: An Effective and Ethical Approach to Leptospirosis Control in Australia. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(11), 389. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110389>
- Philip, N., Bahtiar Affendy, N., Ramli, S. N. A., Arif, M., Raja, P., Nagandran, E., Renganathan, P., Taib, N. M., Masri, S. N., Yuhana, M. Y., Than, L. T. L., Seganathirajah, M., Goarant, C., Goris, M. G. A., Sekawi, Z., & Neela, V. K. (2020). *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri* are the dominant *Leptospira* species causing human leptospirosis in Central Malaysia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3), e0008197. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008197>
- Picardeau, M. (2015). Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 43-63). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4
- Picardeau, M. (2017a). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Picardeau, M. (2017b). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Picardeau, M. (2023). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. Minutes of the closed meeting, 14 November 2022, Bangkok, Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(11), 006131. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006131>
- Pujato, N., Gimenez, J. M., Peretti, L. E., Landolt, N. Y., Jacob, P., Chiani, Y. T., Schmeling, M. F., Miraballes, I., & Vanasco, N. B. (2024). Development of a new accurate lateral flow immunoassay for diagnosis of human leptospirosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 43(10), 1959-1968. <https://doi.org/10.1007/s10096-024-04912-w>

- Qiagen. (2007). Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol). En *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (pp. 27-29).
- Rajapakse, S. (2022). Leptospirosis: Clinical aspects. *Clinical Medicine (London, England)*, 22(1), 14-17. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>
- Rajapakse, S., Rodrigo, C., Balaji, K., & Fernando, S. D. (2015). Atypical manifestations of leptospirosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(5), 294-302. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv026>
- Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., Zhang, Y.-X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.-F., Jiang, H.-Q., Jia, J., Tu, Y.-F., Jiang, J.-X., Gu, W.-Y., Zhang, Y.-Q., Cai, Z., Sheng, H.-H., Yin, H.-F., ... Zhao, G.-P. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422(6934), 888-893. <https://doi.org/10.1038/nature01597>
- Ricardo, T., Jacob, P., Chiani, Y., Schmeling, M. F., Cornejo, P., Ojeda, A. A., Teta, P. V., Vanasco, N. B., & Previtali, M. A. (2020). Seroprevalence of leptospiral antibodies in rodents from riverside communities of Santa Fe, Argentina. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(4), e0008222. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008222>
- Ricardo, T., Monje, L. D., Landolt, N., Chiani, Y. T., Schmeling, M. F., Beldoménico, P. M., Vanasco, N. B., & Previtali, M. A. (2018). Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 42, e83. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2018.83>
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Rossetti, C. A., Liem, M., Samartino, L. E., & Hartskeerl, R. A. (2005). Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 107(3), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.015>
- Salaün, L., Mérien, F., Gurianova, S., Baranton, G., & Picardeau, M. (2006). Application of

- Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3954-3962. <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06>
- Schröder, C., & Steimer, W. (2018). gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *PloS One*, 13(2), e0192414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192414>
- Scialfa, E., Brihuega, B., Venzano, A., Morris, W. E., Bolpe, J., & Schettino, M. (2013). First Isolation of *Leptospira interrogans* from *Lycalopex griseus* (South American Gray Fox) in Argentina Shows New MLVA Genotype. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(1), 168-172. <https://doi.org/10.7589/2011-07-219>
- Shao, W., Khin, S., & Kopp, W. C. (2012). Characterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Biopreservation and Biobanking*, 10(1), 4-11. <https://doi.org/10.1089/bio.2011.0016>
- Silva-Ramos, C. R., Chala-Quintero, S. M., Faccini-Martínez, Á. A., Hidalgo, M., Pulido-Villamarín, A. del P., Pérez-Torres, J., & Cuervo, C. (2022). Pathogenic *Leptospira* Species in Bats: Molecular Detection in a Colombian Cave. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(6), 84. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7060084>
- Soo, Z. M. P., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2020). Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta Tropica*, 201, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105183>
- Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(3), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- Sykes, J. E., Reagan, K. L., Nally, J. E., Galloway, R. L., & Haake, D. A. (2022). Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. *Pathogens*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5:

- Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpai boon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A. T., Suputtamongkol, Y., White, N. J., Feil, E. J., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2007). A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, 1(1), e56. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056>
- Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L. D., Limpai boon, R., Hoffmaster, A. R., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2011a). Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and *lipl32* Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *PLoS ONE*, 6(1), e16236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236>
- Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L. D., Limpai boon, R., Hoffmaster, A. R., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2011b). Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and *lipl32* Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *PLOS ONE*, 6(1), e16236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236>
- Thanakiatkrai, P., & Welch, L. (2012). Using the Taguchi method for rapid quantitative PCR optimization with SYBR Green I. *International Journal of Legal Medicine*, 126(1), 161-165. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0558-5>
- Toyokawa, T., Ohnishi, M., & Koizumi, N. (2011). Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(1), 111-121. <https://doi.org/10.1586/eri.10.151>
- Vanasco, N. B., Jacob, P., Landolt, N., Chiani, Y., Schmeling, M. F., Cudos, C., Tarabla, H., & Lottersberger, J. (2016). Diagnostic accuracy of an IgM enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with 2 polymerase chain reactions for early diagnosis of human leptospirosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(4), 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.002>

- Vanasco, N. B., Schmeling, M. F., Chiani, Y., Lottersberger, J., & Tarabla, H. D. (2012). Diagnóstico de leptospirosis humana: Evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. *Salud Pública de México*, 54(5), 530-536.
- Vanasco, N. B., Schmeling, M. F., Lottersberger, J., Costa, F., Ko, A. I., & Tarabla, H. D. (2008). Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999–2005). *Acta Tropica*, 107(3), 255-258. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.007>
- Vanasco, N. B., Sequeira, M. D., Sequeira, G., & Tarabla, H. D. (2003). Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(3), 227-235. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00144-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00144-2)
- Varni, V., Chiani, Y., Nagel, A., Ruybal, P., Vanasco, N. B., & Caimi, K. (2018). Simplified MLST scheme for direct typing of *Leptospira* human clinical samples. *Pathogens and Global Health*, 112(4), 203-209. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1480137>
- Varni, V., Ruybal, P., Lauthier, J. J., Tomasini, N., Brihuega, B., Koval, A., & Caimi, K. (2014). Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. Typing worldwide. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 22, 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.002>
- Vázquez, J. A., & Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: El marcador molecular de la era de Internet. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(02), 113-120.
- Verma, V., Goyal, M., Kala, D., Gupta, S., Kumar, D., & Kaushal, A. (2020). Recent advances in the diagnosis of leptospirosis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 25(9), Article 9. <https://doi.org/10.2741/4872>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M. K. N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid

assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

- Weiss, S., Menezes, A., Woods, K., Chanthongthip, A., Dittrich, S., Opoku-Boateng, A., Kimuli, M., & Chalker, V. (2016). An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004996>
- World Health Organization. (2003). *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>
- Zhang, C., Yang, H., Li, X., Cao, Z., Zhou, H., Zeng, L., Xu, J., Xu, Y., Chang, Y.-F., Guo, X., Zhu, Y., & Jiang, X. (2015). Molecular Typing of Pathogenic *Leptospira* Serogroup Icterohaemorrhagiae Strains Circulating in China during the Past 50 Years. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003762>