

Tesis Doctoral

Epidemiología molecular y genómica comparativa de *Leptospira* spp. en Argentina

Varni, Vanina Delia

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Varni, Vanina Delia. (2015-03-30). Epidemiología molecular y genómica comparativa de *Leptospira* spp. en Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Varni, Vanina Delia. "Epidemiología molecular y genómica comparativa de *Leptospira* spp. en Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Epidemiología molecular y genómica comparativa de *Leptospira* spp. en Argentina

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Vanina Delia Varni

Director de tesis: Dra. Karina Caimi

Director Asistente: Dra. Paula Ruybal

Consejero de Estudios: Dra. Viviana Confalonieri

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA

Buenos Aires, 2015

Epidemiología molecular y genómica comparativa de *Leptospira* spp. en Argentina

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Leptospira* y constituye una zoonosis de amplia distribución mundial. La enfermedad puede ser contraída a través del contacto con ambientes contaminados con orina de animales infectados, donde la principal vía de transmisión es el agua. Los brotes de leptospirosis en Argentina están asociados a cambios climáticos y en particular a inundaciones. A pesar de ello, en nuestro país existe escasa información de la situación epidemiológica actual de la enfermedad, principalmente debido a la subnotificación de casos y a su persistencia de tipo endémico en los animales.

En los últimos años se han reforzado los análisis tendientes al conocimiento epidemiológico de esta enfermedad. En el campo de la epidemiología molecular, se desarrollaron distintos enfoques basados en PCR para la identificación y tipificación de aislamientos de *Leptospira*, siendo las más utilizadas: MLVA (análisis de VNTRs en múltiples loci) y MLST (tipificación por secuenciación de múltiples loci). Ambas tecnologías se basan en la amplificación por PCR, con la diferencia de que en el primer caso se trata de elementos de tipo minisatélite (unidades repetitivas en un rango de 8 a 100 pares de bases) y en el segundo caso los blancos de amplificación constituyen fragmentos de genes conservados o *housekeeping* que son secuenciados para su posterior análisis. Esta última se ha convertido en una técnica líder entre los métodos de tipificación molecular, debido a su alto poder discriminatorio entre distintos aislamientos bacterianos, su fácil aplicación y estandarización, además de la posibilidad de transmitir la información obtenida en distintos laboratorios a través de bases de datos públicas. Asimismo, las secuencias génicas obtenidas son aplicables a estudios poblacionales y epidemiológicos.

En este trabajo se evaluaron y desarrollaron los principales métodos para la tipificación de *Leptospira*; la evaluación y aplicación de las técnicas MLVA y MLST permitieron identificar genotipos circulantes de manera mayoritaria entre aislamientos argentinos, tanto provenientes de animales de producción como en humanos. Se logró generar un nuevo esquema de MLST (7LA) para leptospirosis patógenas a partir de la combinación de dos esquemas existentes, optimizando y unificando la metodología de tipificación. Las secuencias génicas generadas en este trabajo se encuentran publicadas en una base de datos disponible en internet (<http://pubmlst.org/leptospira/>), donde además de acceder a las mismas, puede aplicarse la metodología para la determinación de genotipos a partir de nuevos aislamientos, posibilitando la comparación de cepas a nivel mundial. El nuevo esquema se aplicó no solamente a los aislamientos argentinos, sino que se utilizó en la tipificación *in silico* a partir de 283 secuencias genómicas de aislamientos y cepas de referencias mundiales que fueron generadas en el marco de un proyecto de secuenciación genómica de este género. Se establecieron 199 genotipos diferentes donde el perfil de MLST

denominado ST47 agrupó el 34 % de los aislamientos estudiados, similarmente a lo ocurrido para las muestras argentinas.

Como consecuencia de los análisis filogenéticos y de formación de complejos clonales, se logró establecer una correlación entre genotipos y serogrupos al que pertenecen los aislamientos, aportando de esta manera una alternativa complementaria al diagnóstico serológico actual. En este sentido, se logró también la generación de un esquema de MLST reducido utilizando tan sólo tres de los siete marcadores del esquema 7LA. El esquema reducido (3LA) permitió la tipificación molecular directamente a partir de muestras clínicas, sin necesidad de contar con el aislamiento, que muchas veces es sumamente difícil de lograr debido a las características propias de esta bacteria.

Este trabajo permitió entonces profundizar en el conocimiento de la variabilidad genética del género *Leptospira* y así generar información epidemiológica adecuada que pueda ser utilizada en programas de control y métodos de diagnóstico de esta enfermedad, constituyendo el primer trabajo en su tipo realizado en nuestro país.

PALABRAS CLAVE: *Leptospira*, epidemiología, *Multilocus Sequence Typing*, serogrupos, genotipos, diversidad genética.

Molecular epidemiology and comparative genomics of *Leptospira* spp. in Argentina

Leptospirosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*, and constitutes a zoonosis of worldwide distribution. The water becomes the main route of transmission when it is contaminated by the urine of infected animals. The outbreaks of leptospirosis in Argentina are associated to climate changes and particularly to the occurrence of floods. However, there is little information on the current epidemiological situation of the disease in our country, mainly due to underreported cases and the persistence of endemicity in animals.

Recently, epidemiological analyses have strengthened the understanding of this disease. In the field of molecular epidemiology, PCR-based approaches for the identification and typing of isolates of *Leptospira* have been developed. Currently, the most frequently used approaches are MLVA (Multiple Locus VNTRs Analysis) and MLST (Multilocus Sequence Typing). Both technologies are based on PCR amplification. However, for MLVA the amplification targets are minisatellite elements (repeats in a range of 8 to 100 base pairs), whereas MLST targets fragments of housekeeping genes that are sequenced for further analysis. MLST has become a leading technique among the molecular typing methods, because of its high discriminatory power between different bacterial isolates, easy application and standardization, plus the ability to share information obtained in different laboratories through public databases. Besides, the gene sequences generated by this method are applicable to population and epidemiological studies.

In this work, we evaluated and developed the main methods for typing *Leptospira*. The implementation of MLVA and MLST techniques led to the identification of major genotypes circulating among Argentine isolates from both livestock and humans. A new MLST scheme (7LA) was generated for pathogenic leptospires by optimizing and unifying two pre-existing MLST strategies. The gene sequences generated through this work have been published in a database available online (<http://pubmlst.org/leptospira/>). The methodology can also be applied for the genotyping of new isolates, enabling the comparison of genotypes worldwide. In addition, the new scheme was applied not only to Argentine isolates, but was used *in silico* for the characterization of 283 genomic sequences of isolates and strains of global distribution, which were generated as part of a genome sequencing project dedicated to this genus. A total of 199 different genotypes were established, and the MLST allelic profile named ST47 grouped 34% of the studied isolates, in agreement with the previous studies on Argentine samples.

As a result of the phylogenetic and clonal complexes analyses, we could establish a correlation between genotypes and serogroups, thus providing a complementary alternative to the current serological diagnosis. In this regard, the generation of a reduced MLST scheme was also achieved, by selecting only three of the seven markers from the 7LA scheme. The reduced MLST scheme (3LA) was applied to the molecular typing

from clinical sample without the need of isolation, which is often difficult to achieve because of the particular characteristics of this bacterium.

In summary, this work allowed us to deepen the understanding of the genetic variability of the genus *Leptospira*, thus contributing with suitable epidemiologic information useful to apply in the design of control strategies and also diagnostic methods for this illness. Thus, this study constitutes the first work of its kind conducted in our country.

KEYWORDS: *Leptospira*, epidemiology, *Multilocus Sequence Typing*, serogroups, genotypes, genetic diversity.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que me acompañaron durante este proceso, tanto en los aspectos académicos como con su amistad y apoyo cotidiano, e hicieron posible que hoy esté llegando a finalizar este camino.

A mis directoras, Karina y Paula, en primer lugar por haber confiado en mí desde un inicio, y haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado en el Instituto de Biotecnología, en un tema muy alejado del que me había formado.

En segundo lugar, por todo el esfuerzo y entusiasmo que volcaron para cumplir con su rol en la dirección de mi tesis. Por tenerme paciencia y haber estado al lado mío, desde un principio cuando tuvieron que acompañarme en el aprendizaje de aspectos básicos de biología molecular hasta enseñarme como usar una pipeta automática (sí!). Y se necesitaba mucha paciencia..!!

Por último, les agradezco desde el aspecto humano, porque durante estos años, al tiempo que desarrollé esta etapa tan importante a nivel laboral, atravesé momentos importantes en mi vida personal, y aunque no formaba parte de sus tareas ambas estuvieron presentes. Brindándome tranquilidad y también acompañándome, haciendo que el trabajo fuese en esos momentos uno de los espacios donde encontraba los estímulos y ganas para seguir adelante.

Quiero agradecer también a Martín y Andrea, quienes me ayudaron a resolver problemas, me dieron muy buenas sugerencias y me apoyaron para que de a poco mi trabajo fuese mejorando. Muchas gracias!

Ariel, nuestro bioinformático amigo, siempre conté con vos al instante! Espero sigamos colaborando y avanzando con el análisis genómico!

Respecto de mis compañeros de laboratorio... TUBERCULOSIS - E.COLI - LEPTOSPIROSIS qué puedo decir... tuve mucha suerte!!! Yami, Mariano, Nati, y recientemente Ariel y Jimena.

La verdad es que nos llevamos tan bien y nos reímos tanto día a día, que a veces me cuesta recordar que estoy en el trabajo. Es por eso que tuve que escaparme del laboratorio durante la escritura de la tesis!!

Yamila, Mariano y Nati, son excelentes personas, siempre solidarios , me hicieron sentir que contaba con ustedes tanto en lo laboral como lo personal, y aunque nuestros temas de trabajo son diferentes el saber que hay gente cerca que siempre te va a dar una mano, eso no tiene precio (y no es un slogan...).

Yami, te conozco desde la infancia y las casualidades de la vida nos ubicaron en el mismo laboratorio, donde tuve la oportunidad de conocerte mucho más y me considero muy afortunada por eso. Y Marian siempre alegrando el laboratorio!! sos una gran persona, un excelente compañero y amigo. Ari, hace poquito que somos "compañeros leptospirosos" pero ya nos llevamos muy bien y me ayudaste mucho en esta última etapa! Gracias!

Es un placer trabajar con ustedes, los quiero mucho.

Lauri, somos amigas desde poco antes de ser compañeras en el IB. Fuimos a la par en este proceso y nos acompañamos mutuamente. Hace rato que nuestra amistad trasciende el ámbito laboral, te quiero mucho!

También quiero agradecerles a Ludmila y Eliana, mis amigas del lab Hemoparásitos. Con Lud nos conocimos más y disfrutamos mucho los cursos que hicimos juntas, tenemos mucho en común!! Eli, somos amigas desde hace tiempo pero en estos últimos momentos recurrí más a vos y siempre encontré contención, tu ayuda y amistad fueron muy valiosas, no entendemos muy bien! Gracias a ambas!

Quiero agradecer a mis otros compañeros y amigos del IB, con los que comparto los días, los almuerzos, y también valoro mucho la amistad de cada uno en particular: Emiliano, Damián, Ale, Vale M., Natis (Aguirre y Alonso), Mariana, Pepe, Sole.

Vale Rocha!!! una gran amiga que gané en el IB, extraño nuestras charlas!

A mis amigas de siempre. Mónica, Rocío, Fernanda, compartimos la carrera así que, quién mejor que ustedes para entendernos y acompañarnos. Son excelentes amigas, siempre "al pie del cañón", tengo mucha suerte de haberlas conocido y conservado, por siempre! Y Magalí, siempre te interesaste por mi trabajo aunque estuvieras muy lejana a ello, y me apoyaste de corazón. Las quiero muchísimo!

Die, nos acompañamos durante la mayor parte de este proceso y aunque el camino fue difícil sé que cuento y contaré con tu apoyo.

Quiero agradecer especialmente a mi familia : mis papás, mi hermano, mi cuñada, mi abuela y mi hermosa sobrinita!! me apoyan desde siempre, se entusiasman cuando les cuento de mi trabajo y por supuesto están y siempre estarán cuando los necesite. Haga lo que haga ellos estarán contentos y orgullosos. Hasta mi abuela está al tanto de todo con sus 90 pirulos. Los quiero a todos con el alma!

Finalmente quiero expresar que me siento agradecida por haber recibido educación universitaria pública y gratuita, al FONCyT, al CONICET y al INTA por haberme dado la posibilidad de realizar mi doctorado, y próximamente mi postdoctorado.

Le dedico esta tesis a toda mi familia, incluyendo mis amigas que son mi familia del corazón.

Gracias a todos.

"Para hacer realidad lo posible es necesario
probar de vez en cuando lo
imposible."

Hermann Hesse

Índice

1. Índice

1.	Índice	1
2.	Abreviaturas	4
3.	Introducción	5
3.1.	<i>Leptospira</i> y Leptospirosis	5
3.1.1.	Generalidades de la Leptospirosis	5
3.1.2.	Género <i>Leptospira</i>	7
3.1.3.	Taxonomía del género <i>Leptospira</i>	9
3.1.4.	Patogenia del género <i>Leptospira</i>	12
3.2.	Curso clínico de la enfermedad	14
3.3.	Diagnóstico de la enfermedad	16
3.4.	Tratamiento de la Leptospirosis	19
3.5.	Profilaxis	20
3.6.	Epidemiología de la Leptospirosis	21
3.6.1.	Leptospirosis en Animales de producción y domésticos	25
3.6.2.	Situación Epidemiológica en Argentina	26
3.7.	Epidemiología molecular en <i>Leptospira</i>	27
3.7.1.	Identificación de especie mediante el gen 16S ARNr	29
3.7.2.	MLVA	30
3.7.3.	MLST	32
3.8.	Genómica de <i>Leptospira</i>	34
4.	Hipótesis y Objetivos	39
5.	Materiales y Métodos	41
5.1.	Cepas: características y procedencia	41
5.2.	Cultivo de <i>Leptospira</i>	42
5.2.1.	Medios de cultivo	42
5.2.1.1.	Medio enriquecido EMJH	42
5.2.1.2.	Medio semisólido Fletcher	42
5.2.2.	Seguimiento de cultivos y repiques	43
5.3.	Extracción de ADN genómico	43
5.4.	Protocolos de Amplificación por PCR	44
5.4.1.	16 ARNr para <i>Leptospira</i>	44
5.4.2.	MLVA	45
5.4.3.	MLST	46
5.4.3.1	Esquemas de MLST	46
5.4.3.2	Reacciones de amplificación por PCR	47
5.4.3.2.a	Esquema 7LT	47
5.4.3.2.b	Esquema 6LH	49
5.5.	Purificación de productos de PCR	50
5.6	Secuenciación de productos de PCR	51

5.7.	Procesamiento general de secuencias	51
5.7.1.	Generación de secuencia consenso	51
5.7.2.	Alineamiento de secuencias	52
5.8.	Determinación de especie: Análisis del gen 16S ARNr	52
5.9.	Tipificación por MLVA	53
5.9.1	Electroforesis Analítica	53
5.9.2	Análisis de datos	53
5.10.	Tipificación por MLST	54
5.10.1.	Determinación de <i>Sequence Type</i> (ST)	54
5.11.	Análisis conjunto de VNTRs y MLST	59
5.11.1	Análisis filogenético	59
5.11.2.	Cálculo del índice de poder discriminatorio	60
5.12.	Reevaluación de esquemas de MLST	60
5.12.1.	Colección de cepas tipificadas	60
5.12.2	Evaluación de 12 loci	61
5.12.2.1.	Análisis de asociación de STs	61
5.12.2.2.	Cálculo de parámetros de diversidad	61
5.12.2.3.	Filogenia	62
5.12.3.	Optimización del esquema	63
5.12.3.1.	Número óptimo de loci	63
5.12.4.	Tipificación mediante esquema de 7 loci Argentino (7LA)	63
5.13.	MLST 7LA <i>in silico</i> a partir de genomas	64
5.13.1	Selección y descarga de secuencias genómicas	64
5.14.	Esquema de MLST reducido	64
5.14.1	Selección inicial de loci	65
5.14.2.	Evaluación de esquema reducido	65
5.14.3	Aplicación en muestras clínicas	65
5.14.3.1.	Muestras clínicas	65
5.14.3.2.	Determinación de especie	65
5.14.3.3.	Tipificación por MLST reducido	66
6.	Resultados	68
	Capítulo 1 - Aplicación y comparación de metodologías de tipificación molecular	69
6.1.	Tipificación por MLST	70
6.1.1.	Rediseño de <i>primers</i> esquema 7LT	70
6.1.2.	Tipificación por esquema 7LT	72
6.1.3.	Variabilidad y selección de los loci de MLST 7LT	73
6.1.4.	Análisis de asociación de STs del esquema 7LT	74
6.1.5	Relaciones filogenéticas entre los STs del esquema 7LT	75
6.2.	Tipificación por MLVA	76
6.3.	Análisis combinado de VNTRs y STs: STVNTR	78
	Capítulo 2 - Reevaluación de esquemas de MLST	81
6.4.	Evaluación de esquemas de MLST	81
6.4.1	Tipificación mediante 12 loci	82
6.4.1.1	Asociación de STs del esquema 12L	83

6.4.1.2	Filogenia 12 loci	84
6.4.2	Optimización del esquema	85
6.4.3.	Aplicación del esquema 7LA	87
6.4.3.1.	Parámetros de diversidad	88
6.4.3.2.	Análisis de asociación de STs del esquema 7LA	88
6.4.3.3.	Análisis filogenéticos del esquema 7LA	92
6.5.	Aplicación del perfil alélico para la inferencia del serogrupo	99
6.6.	Generación de base de datos disponible en internet para el esquema de MLST combinado (7LA): pubmlst.org/Leptospira/	100
	Capítulo 3- MLST <i>in silico</i> a partir de genomas	103
6.7.	MLST <i>in silico</i> a partir de genomas	103
6.7.1.	Inclusión del esquema (7LA) en el Centro de Epidemiología Genómica	103
6.7.2.	Tipificación de 300 cepas de <i>Leptospira</i> mediante MLST genómico	105
6.7.2.1	Análisis de asociación de STs (7LA)	108
	Capítulo 4 - Aplicación de MLST para tipificar muestras clínicas	112
6.8.	MLST reducido para la aplicación en muestras clínicas	112
6.8.1	Selección de una combinación reducida de loci	112
6.8.2.	Evaluación de 3LA	113
6.8.2.1	Determinación de STs	113
6.8.3.	Aplicación de 3LA en muestras clínicas	114
6.8.3.1.	Relaciones clonales y filogenéticas	115
6.8.4.	Inferencia de serogrupo utilizando MLST reducido y bases de datos	119
7.	Discusión	123
8.	Conclusiones	138
9.	Anexo	140
10.	Bibliografía	165

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico ribosomal
cm/cms	Centímetro/s
CCs	Complejos Clonales
dNTPs	Dideoxynucleótidos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
fg	Fentogramos
h/hs	Hora/Horas
Kb	Kilobase
M	Molar
MAT	<i>Microagglutination test</i> (Test de microaglutinación)
ML	<i>Maximun Likelihood</i> (Máxima Verosimilitud)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipificación por Secuencias de Multiples loci)
MLVA	<i>Multilocus Variable Analysis</i>
mi	Minuto
ml.	Mililitro
mM.	Milimolar
ng	Nanogramo
NJ	Neighbor Joining
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Poder Discriminatorio
pmoles	Picomoles
RFLP	Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción.
Rpm	Revoluciones por minuto
SLV	<i>Single Locus Variant</i> (Variante de Locus Unico)
DLV	<i>Doble Locus Variant</i> (Variante de doble loci)
TLV	<i>Triple Locus Variant</i> (Variante de triple loci)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Nucléotido único)
STs	<i>Sequence Type/s</i> (Perfil alélico)
STN	<i>Sequence Type New</i> (Nuevo Perfil Alélico)
TE	Tris-EDTA
µg	Microgramos
µl	Microlitros
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts
VNTRs	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número variable en las repeticiones en tándem).

Introducción

3. Introducción

3.1. *Leptospira* y leptospirosis

3.1.1 Generalidades de la Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica ampliamente distribuida a nivel mundial (LERG, 2011), causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*. Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública en muchas partes del mundo, y actualmente se la considera una enfermedad infecciosa emergente (Levett, 2001). La extensión de la distribución geográfica de la leptospirosis está directamente relacionada con el variado rango de animales que pueden contraer la infección por *Leptospira* spp. Entre ellos se incluyen los animales domésticos, los animales de producción y una gran variedad de animales salvajes, principalmente mamíferos, pero también puede afectar a anfibios, reptiles y peces (Minette, 1983). La transmisión puede ocurrir tanto a través del contacto directo con animales infectados, como indirectamente por el contacto con agua y ambientes contaminados por la orina de dichos animales, siendo esta última la fuente de transmisión más común (Hartskeerl et al., 2011).

La infección causada por *Leptospira* spp. puede presentar un amplio espectro de manifestaciones, cuyos extremos constituyen la enfermedad aguda, como en el caso de los humanos, y la infección crónica asintomática, como se manifiesta en la mayoría de los roedores. Los animales con infección crónica asintomática actúan como reservorios de la enfermedad, pues las leptospiras persisten en sus túbulos renales y son liberadas a través de la orina durante toda su vida, generando la contaminación del ambiente (Bharti et al., 2003). Debido a que algunas especies patógenas de leptospiras poseen la capacidad de subsistir en el agua y en ambientes húmedos y cálidos durante meses, esta característica promueve la transmisión indirecta de la infección (Hartskeerl et al., 2011).

La leptospirosis posee un alto impacto en el ámbito de la salud humana a nivel global (LERG, 2011), y está presente tanto en comunidades rurales como urbanas. Sin embargo, esta enfermedad existe en forma endémica en zonas de climas cálidos y altas precipitaciones, como en los trópicos, dado que estas condiciones climáticas junto con factores sociales asociados constituyen un entorno que favorece la transmisión (Levett 2001, Bharti et al., 2003, Hartskeerl et al., 2011).

Debido a los brotes ocurridos en la década del 90, principalmente en Latinoamérica luego de las inundaciones que se produjeron por los cambios climáticos asociados a la corriente del Niño, la leptospirosis fue catalogada como una enfermedad reemergente (Organización Panamericana de la Salud, 1998).

En los humanos la leptospirosis constituye una enfermedad aguda, pero puede presentar un espectro muy amplio de manifestaciones, cursando en forma asintomática o presentando síntomas gripales leves. En sus formas más graves genera un compromiso multisistémico que lleva rápidamente a la muerte. El síndrome de Weil (Weil, 1886) constituye una de las manifestaciones clínicas más severas, caracterizado por ictericia, hemorragias y fallas en distintos órganos principalmente el riñón, con un porcentaje de mortalidad que alcanza el 50 % (Levett, 2001). Asimismo, en los últimos años se ha reconocido en forma frecuente la manifestación grave en forma de síndrome pulmonar hemorrágico (SPHS) (Trevejo et al., 1998; Segura et al., 2005; Ko et al., 2009).

Además de sus consecuencias para la salud humana, la leptospirosis es también una enfermedad relevante en el ámbito veterinario, asociada a importantes pérdidas económicas (Ellis, 1994). La enfermedad es común tanto en el ganado como en las mascotas, y puede manifestarse de formas agudas, intermedias o crónicas dependiendo de la especie de hospedador (Ko et al., 2009). En los perros causa una enfermedad aguda, pudiendo producir sangrado y falla renal. Entre los animales de producción está presente en bovinos, cerdos, cabras, ovejas y equinos. En el ganado bovino, porcino y caprino puede causar una infección aguda con presencia de ictericia, pero con una persistencia prolongada en los riñones (Faine et al., 1999). Los síntomas en estos animales se asocian a desordenes reproductivos como mastitis, abortos y pariciones prematuras, e inclusive la muerte. En el caso del ganado lechero se ha observado reducción en la producción de leche (Seijo et al., 2002). Aunque la tasa de mortalidad es baja (alrededor del 5%), la morbilidad suele ser elevada, pudiendo llegar al 100%. Asimismo la industria agropecuaria sufre perjuicios económicos adicionales cuando se aplican regulaciones de cuarentena a nivel nacional y/o internacional. Por la correlación directa con la situación económica, y al afectar a países agroexportadores, no sorprende que tenga un fuerte impacto en un país como la República Argentina.

3.1.2 Género *Leptospira*

Las leptospiras son espiroquetas aerobias, extracelulares y muy móviles, que presentan características tanto de bacterias Gram negativas como de Gram positivas, aunque en general se las relaciona más a las primeras (Haake et al., 2000). Las leptospiras tienen aproximadamente 0,25 μm de diámetro por 6–25 μm de largo; en preparaciones húmedas se pueden visualizar directamente en microscopio de campo oscuro. Los estudios de microscopía electrónica mostraron que la morfología de *Leptospira* consiste en un cuerpo celular helicoidal, recubierto por una pared celular y envuelto a su vez por una membrana externa (Figura 1). Ésta contiene porinas que permiten el intercambio de solutos entre el espacio periplásmico y el medio extracelular. Dicha envoltura se ve afectada tanto por el agua salada como por la desecación (Plank y Dean, 2000). En el espacio periplásmico que yace entre la pared y la membrana externa, se ubican 2 filamentos axiales, ubicados en las extremidades del cuerpo celular y con sus extremos libres dirigidos hacia el centro de la célula. Los filamentos son estructuras citoesqueléticas que se contraen periódicamente causando la rotación del espiral y permitiendo el movimiento de la bacteria.

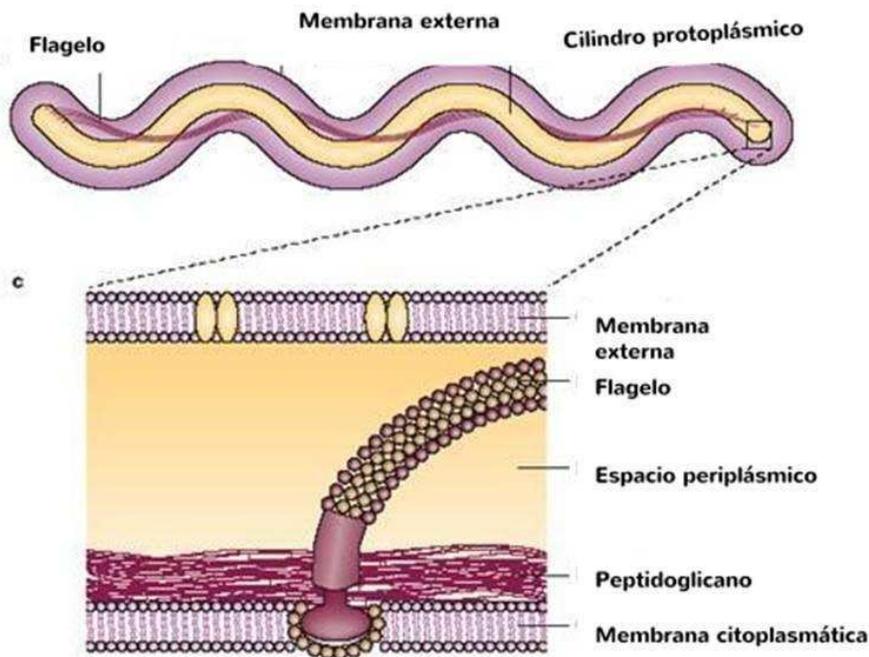


Figura 1. Diagrama de la morfología general y los componentes de la membrana de una espiroqueta.

La apariencia y la movilidad de las leptospiras varían con la naturaleza del medio en el cual crecen. En los medios líquidos, aparecen curvadas o con uno o ambos extremos doblados en forma de signo de interrogación: de allí deriva el nombre de la especie *Leptospira interrogans* (Figura 2).



Figura 2. Micrografía electrónica de una leptospira, donde se observan los extremos característicos en forma de gancho (Reproducida de Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Las leptospiras se cultivan en medios artificiales con 10% de suero de conejo o 1% de albúmina sérica bovina, a pH 6,8–7,4 (Ellis y Michno, 1976, Barthi et al., 2003). El medio también debe contener ácidos grasos de cadena larga, ya que es la fuente de carbono que utiliza la bacteria. Para preparar un medio selectivo pueden adicionarse diferentes antibióticos, siendo el más común el 5-fluoroacilo. La temperatura de crecimiento óptima es de 28–30 °C, aunque las especies saprófitas pueden crecer a temperaturas menores. Es importante verificar que no haya bacterias contaminantes luego de 3–4 días de cultivo y realizar un subcultivo a los 7–21 días, aunque las leptospiras pueden sobrevivir en cultivos líquidos estáticos durante meses y a veces hasta años (Faine et al., 1999). El medio más utilizado es el Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), el cual contiene 1% de albúmina sérica bovina y Tween-80 como fuente de ácidos grasos de cadena larga (Ellinghausen y McCullough, 1965; Johnson y Roger, 1967). El medio semisólido Fletcher (peptona, extracto de carne, cloruro de sodio y agar) (Bharti et al., 2003), es frecuentemente utilizado como medio de preferencia para realizar aislamientos. En los medios semisólidos se puede apreciar la formación de un anillo de crecimiento, denominado “zona de Dinger”, donde las leptospiras se concentran ya que allí la tensión superficial del oxígeno es la óptima (Figura 3).

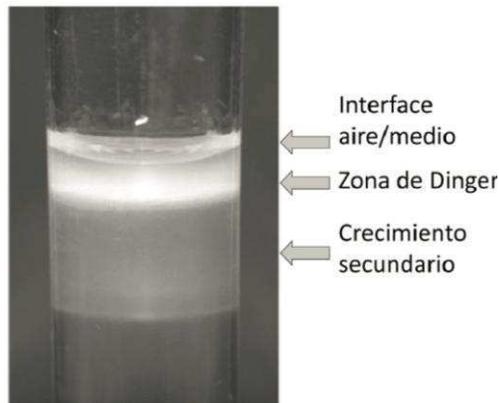


Figura 3. Crecimiento de *Leptospira* en medio semisólido, donde se observa la formación del anillo o zona de Dinger entre la interface aire/medio y la zona de crecimiento secundario. (Reproducido de Zuerner et al., 2005).

3.1.3 Taxonomía del género *Leptospira*

El género *Leptospira* pertenece al filum Spirochaetes, clase Spirochaetes, orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae. El otro género que conforma esta familia es *Leptonema*. Junto con *Leptospira*, las espiroquetas más importantes a nivel médico pertenecen a los géneros *Treponema* y *Borrelia* (familia Spirochaetaceae), por ser agentes causales de dos serias enfermedades que afectan al hombre: sífilis y enfermedad de Lyme respectivamente (Levett, 2001).

Inicialmente, las leptospiras fueron clasificadas en dos especies “fenotípicas”, donde el complejo “interrogans” agrupaba a las cepas patógenas o sospechadas de serlo (*L. interrogans* sensu lato), mientras que el resto de las leptopiras se incluían en el complejo “biflexa” (*L. biflexa* sensu lato), que contenía principalmente cepas saprófitas o ambientales.

A su vez, el análisis mediante la prueba de aglutinación y absorción cruzada con un antígeno homólogo (Cross-Agglutination Absorption Test, CAAT) permitió distinguir a las leptospiras en un nivel subespecífico, dividiéndolas en entidades denominadas serovares (Terpstra, 1992). Cada serovar se define según una conformación antigénica característica, definida por el mosaico de antígenos lipopolisacáridos (LPS) contenidos en la membrana externa, cuyo componente carbohidrato tiene una estructura variable. Los antígenos pueden ser específicos para un determinado serovar o ser compartidos por varios serovares. De esta manera se han identificado más de 60 serovares para las especies saprófitas y más de 300 para las patógenas (Picardeau, 2013). Esta clasificación o serotipificación condujo a la designación de cepas de referencia en

representación de cada serovar. Los serovares que presentan antígenos en común se clasifican por conveniencia en serogrupos.

Recientemente, la aplicación de técnicas moleculares, como la hibridación de ácidos nucleicos, ha permitido desarrollar una clasificación del género *Leptospira* en especies definidas por homología genética (Yasuda et al., 1987; Brenner et al., 1999). La introducción de estas técnicas significó un fuerte impacto para la taxonomía del género dado que la caracterización genética mostró muy poca correlación con la clasificación serológica existente. Por ejemplo, se observó que un serovar puede presentarse en más de una especie, lo cual ilustra la variabilidad en la expresión del genoma de *Leptospira* (Tabla 1). En base a esto se desprendería que ni los serovares, ni los serogrupos son indicativos de las relaciones genéticas entre cepas. En forma inversa, los miembros de un mismo grupo genético no pertenecen necesariamente a la misma categoría serológica. Sin embargo, en la actualidad la clasificación en genoespecies coexiste con las designaciones de "serovar" y "serogrupo", ya que éstas están ampliamente difundidas entre epidemiólogos y clínicos y pueden aportar información complementaria.

Tabla 1. Principales serovares de *Leptospira* observados en distintas especies (Adaptado de Bharti et al., 2003).

Serovares	Especies
Bataviae, Kremastos, Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Grippotyphosa, Bulgarica, Valbuzzi	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hardjo	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>

Actualmente el género *Leptospira* incluye 21 especies (Lehmann et al., 2014), que se establecieron por hibridación de ADN (en base a una homología del 70 % en su ADN y una divergencia máxima del 5 % en sus secuencias relacionadas) y/o filogenia de secuencias del gen *rrs*, codificante para el ARN ribosomal 16S. Los estudios filogenéticos revelaron 3 agrupamientos de especies (Perolat et al., 1998; Cerqueira et al., 2009) coincidentes con sus características de virulencia (Figura 4).

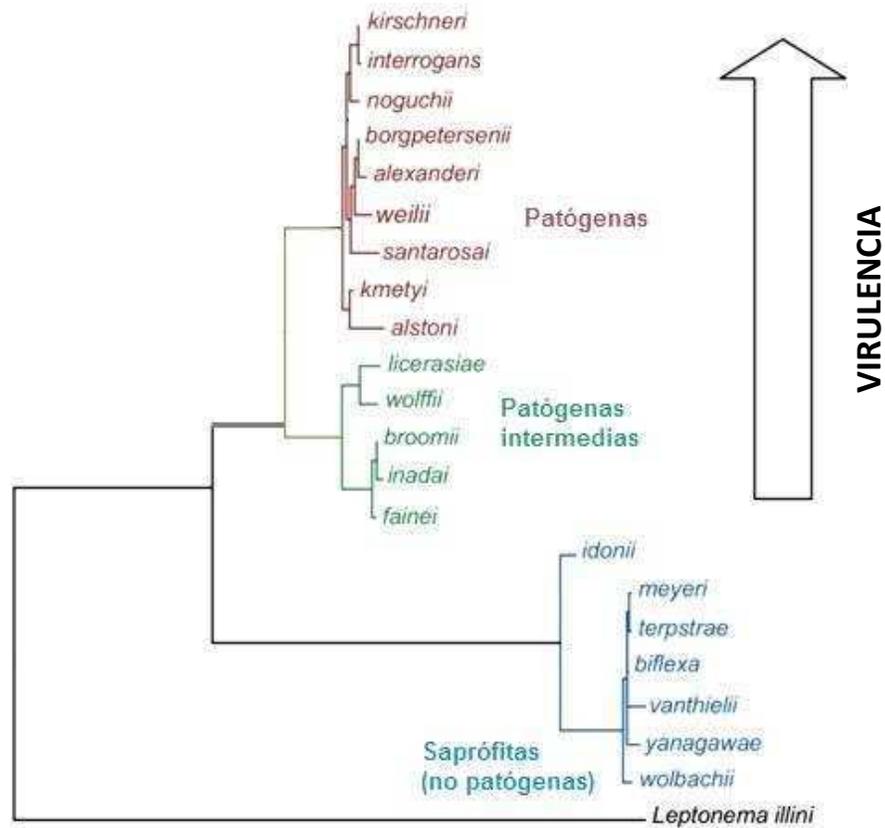


Figura 4. Relaciones filogenéticas establecidas entre especies de *Leptospira* utilizando la secuencia del loci 16S ARNr.. El subgrupo de saprófitas (azul) forma la rama más antigua dentro del género, mientras que otra rama evolutiva más reciente se bifurca en dos subgrupos, que comprenden las especies patógenas (rojo) y al llamado grupo "intermedio" (verde), cuya patogenicidad aún es poco clara. Se utilizó una especie del género *Leptonema* como grupo externo de la filogenia. (Imagen modificada de Lehman et al., 2014).

El primer y más ancestral agrupamiento está constituido por las especies saprófitas, incluyendo a *Leptospira biflexa*, todos microorganismos no patogénicos, de vida libre en superficie y agua. Recientemente se ha incluido en este clado una nueva especie no infecciosa, *L. idonii* (Saito et al., 2013). El segundo subgrupo está integrado por 9 especies patógenas, entre ellas *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii*. Por último, un tercer agrupamiento reúne a todas las especies de "comportamiento intermedio", cuyo rol en la patogenicidad aún no ha sido estudiado en profundidad (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de *Leptospira* clasificadas en patogénicas, no patogénicas y de comportamiento intermedio, representadas por una cepa de referencia.

	Especies	Serovar	Cepa referencia
Patógenas (9)	<i>L. alexanderi</i>	Manhoa	L60
	<i>L. alstonii</i>	Pingchang	80-412
	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Beldrat Batavia 46
	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
	<i>L. kmety</i>	ND	Bejo Iso9
	<i>L. noguchi</i>	Panamá	CZ 214
	<i>L. santarosai</i>	Shermani	1342 K
	<i>L. weilii</i>	Ranarum	ICF
Patogenicidad intermedia (5)	<i>L. broomii</i>	ND	5399
	<i>L. faineii</i>	Hurstbridge	BUT 6
	<i>L. inadai</i>	Lyme	10
	<i>L. licerasiae</i>	Varillal	Var 010
	<i>L. wolfii</i>	ND	Korat H2
Saprófitas (6)	<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc
	<i>L. meyeri</i>	Semarang	Veldrat Semarang 173
	<i>L. terpstrae</i>	ND	H2
	<i>L. vanthielii</i>	Holand	WaZ Holland
	<i>L. wolbachii</i>	Codice	CDC
	<i>L. yanagawae</i>	Saopaulo	Sao Paulo

3.1.4 Patogenia del género *Leptospira*

El conocimiento de la patogénesis de la leptospirosis a nivel celular y molecular, y de las interacciones entre la bacteria y el hospedador aún es limitado respecto de lo que ocurre con otras enfermedades causadas por bacterias (Adler y Moctezuma, 2010; Adler et al., 2011). Las leptospirosis patógenas penetran a través de la piel lastimada y las membranas mucosas, cruzan las barreras tisulares y se diseminan a través de la sangre, estableciendo rápidamente una infección sistémica (Faine et al., 1999). Mientras que en los animales susceptibles a la infección puede

causar daño a los tejidos en múltiples órganos, en los animales reservorios se establecen en los riñones en forma persistente y son liberadas por orina.

Las leptospiras utilizan diferentes estrategias para invadir los tejidos, entre las cuales se encuentra la adhesión a las células del huésped y a la matriz extracelular. A diferencia de las bacterias Gram negativas, cuyo LPS es su principal factor de virulencia, en las leptospiras este rol lo cumplirían las lipoproteínas de membrana externa (Ko et al., 2009). Otro mecanismo de virulencia es la movilidad y la capacidad de desplazarse a través de medios viscosos, factor importante durante la infección inicial y la diseminación hacia órganos distantes (Faine et al., 1999).

Las leptospiras no son organismos intracelulares facultativos, ya que raramente se las observa intracelularmente en los tejidos infectados, sino que aparecerían en forma transitoria dentro de las células a medida que cruzan capas celulares, en estudios *in vitro* (Barocchi et al., 2002); sin embargo aún no se conoce con claridad el mecanismo que utilizan para entrar en las células. Se cree que el paso a través de células no fagocíticas responde a un mecanismo que utilizan estos organismos para diseminarse hacia los órganos blanco y evadir a la acción de la respuesta inmune celular.

Un componente esencial del ciclo de vida de este patógeno es su habilidad para producir transporte renal persistente en los animales reservorios. En las ratas, las leptospiras causan una infección sistémica, pero son eliminadas de todos los órganos a excepción de los túbulos renales (Athanasio et al., 2008, Lourdault et al., 2009). Dichos túbulos son densamente poblados por estas bacterias, las cuales forman agregados con una estructura de tipo biofilm. Asimismo, las leptospiras aisladas de riñones de ratas con infección crónica presentaron cantidades significativamente más altas del antígeno O del LPS, que aquellas aisladas de hígados de hámsters con infección aguda, sugiriendo que la expresión de este antígeno facilitaría la inducción de transporte renal (Nally et al., 2005). Este mecanismo se ve facilitado dado que los túbulos renales son sitios inmunoprivilegiados, lo que puede contribuir al alto grado de persistencia del patógeno en esa zona. Incluso, las leptospiras liberadas en orina pueden disminuir la expresión de proteínas reconocidas por la respuesta inmune humoral en ratas (Monahan et al., 2008).

3.2 Curso clínico de la enfermedad

Las leptospiras patógenas producen una infección sistémica, estableciéndose en forma crónica en los riñones de los animales reservorios, mientras que en los hospedadores susceptibles causan una enfermedad aguda y daño a los tejidos de múltiples órganos. Este es el caso de los seres humanos, que constituyen hospedadores accidentales. El curso de la infección parece estar influido por factores específicos tanto de la bacteria como del hospedador, y la conjunción de los mismos determina la ocurrencia de las diferentes manifestaciones de la enfermedad. Estas pueden variar desde un enfermedad leve con síntomas similares a los de una gripe hasta las formas severas de leptospirosis, con falla hepatorenal o hemorragia pulmonar, pasando por diferentes manifestaciones intermedias.

En los seres humanos, la mayoría de las infecciones causadas por leptospiras son subclínicas o muy leves, y con frecuencia las personas no realizan consultas médicas ya que se resuelven solas. Una proporción menor, pero que comprende la mayoría de los casos reconocidos, se presentan como una enfermedad febril de inicio repentino, similar a una gripe de variada intensidad, que puede progresar hacia una falla multiorgánica, e incluso la muerte (Faine et al., 1999).

La leptospirosis tiene un período de incubación de aproximadamente 1-10 días y la presentación clínica de la enfermedad es generalmente bifásica (Figura 5). La primera fase es aguda y dura aproximadamente una semana. Se denomina leptospirémica o septicémica porque las leptospiras pueden aislarse de la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR). La segunda fase, denominada leptospirúrica o inmune, se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos, presencia de muy pocas leptospiras en sangre y LCR, y excreción de abundantes leptospiras en la orina. Esta fase puede durar hasta 30 días, o incluso meses o años. La mayoría de las complicaciones de la leptospirosis se asocian con la localización de las leptospiras dentro de los tejidos durante la fase inmune, y por lo tanto, ocurren durante la segunda semana de la enfermedad.

La leptospirosis puede tomar dos presentaciones bien reconocidas: anictérica o ictérica. En la primera, el síndrome clínico más importante es la meningitis aséptica, que aunque usualmente dura pocos días, también puede persistir hasta 1 o 2 semanas. Con menor frecuencia aparecen

cambios en la conciencia y/o encefalitis. Si bien los síntomas meníngeos se presentan en el 50% de los pacientes, la muerte es extremadamente rara en este tipo de presentación.

Entre el 5 y 10% de los pacientes con leptospirosis desarrollan la forma icterica de la enfermedad, también conocida como Síndrome de Weil, que se encuentra entre las más severas. Tiene una alta tasa de mortalidad de entre 15 y 40%. Se caracteriza por la aparición de ictericia, deterioro hepático y renal, hemorragia y colapso vascular, el cual puede ser rápidamente fatal (Vinetz et al., 1996, Plank y Dean , 2000). La ictericia es la coloración amarillenta de la piel y las mucosas debida a un aumento de la bilirrubina. La etapa icterica puede ser acompañada por dolor abdominal, diarrea, constipación, hepatoesplenomegalia, náuseas, vómitos y pérdida del apetito. Entre el 2 y el 10% de los casos pueden presentar otras complicaciones como uveítis, que puede ocurrir durante la enfermedad o hasta 1 año posterior a la aparición de síntomas (Vijayacharit et al., 2004). Aunque no se ha encontrado correlación entre síndromes clínicos y serotipos involucrados, se ha observado que la ictericia está presente en el 83% de los pacientes infectados con el serovar Icterohaemorrhagiae y en el 30% de los pacientes infectados con Pomona.

El riñón es uno de los órganos más afectados ya que es donde se alojan las leptospiras, y la leptospirosis es una causa común en los casos de insuficiencia renal aguda. Síntomas renales tales como azotemia, hematuria, proteinuria y oliguria están presentes en el 50% de los pacientes con leptospirosis. La oliguria es un predictor significativo de muerte (Daher et al., 1999).

Complicando aún más el diagnóstico, la leptospirosis severa no siempre se presenta como la clásica tríada de fiebre, ictericia y falla renal, sino que en los últimos años se ha reconocido un nuevo síndrome clínico, caracterizado por hemorragias pulmonares y sin presencia de ictericia. Las manifestaciones pulmonares pueden ocurrir en el 20-70% de los pacientes (Bharti et al., 2003]. Este síndrome se destaca por su presentación fulminante en forma de hemorragia pulmonar masiva y lesión pulmonar aguda, y la tasa de letalidad en estos casos es muy elevada, superando el 50 % (Ko et al., 2009).

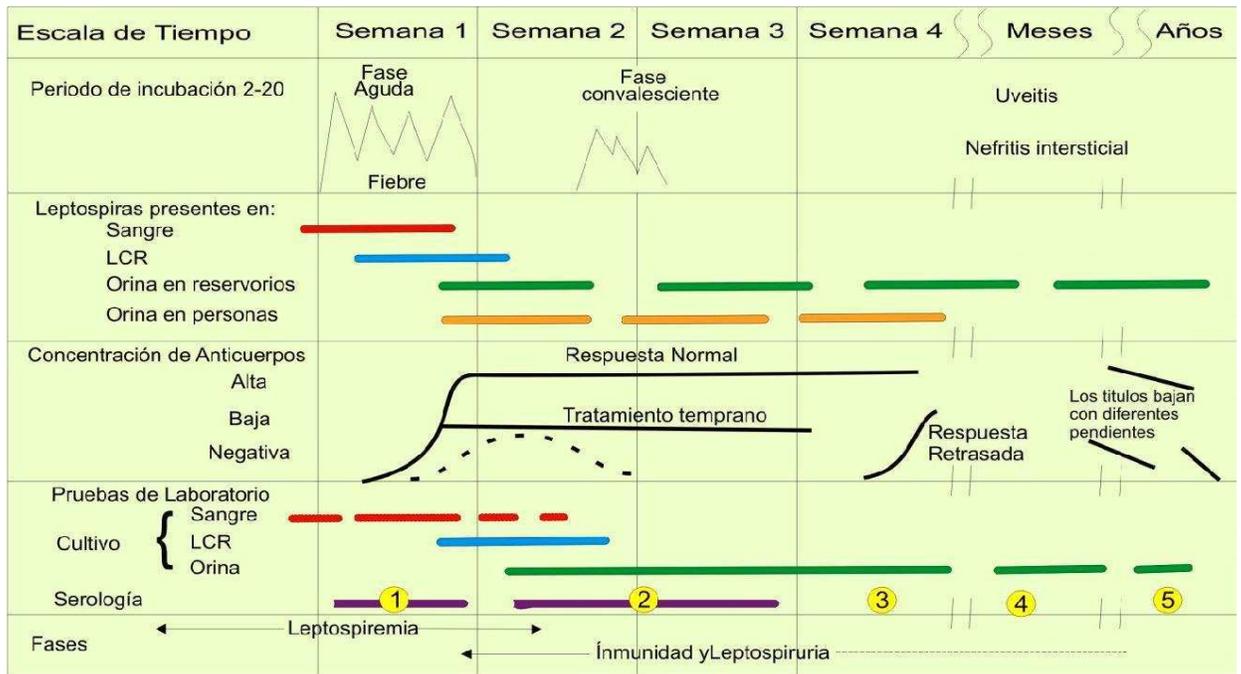


Figura 5. Etapas del desarrollo de la Leptospirosis. En general, se trata de una enfermedad bifásica. En la primera fase se pueden aislar leptospiras de sangre y LCR. El inicio de la segunda fase está determinado por la producción de anticuerpos específicos. Las etapas 3, 4 y 5 sirven de seguimiento de la convalecencia. (Imagen adaptada de Turner, 1969).

3.3 Diagnóstico de la enfermedad

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. Los antecedentes epidemiológicos compatibles se definen de acuerdo a la exposición a factores de riesgo durante los 30 días anteriores al inicio de los síntomas (Moral et al., 2014). Dichos factores de riesgo se clasifican en ambientales y profesionales siendo los principales:

- 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.

El diagnóstico clínico de la leptospirosis es difícil debido a la diversa sintomatología que pueden presentar los pacientes, que hace factible que se confunda con la de otras enfermedades. De esta manera, debe realizarse un diagnóstico diferencial para descartar enfermedades con sintomatología similar, desde infecciones virales comunes como influenza, hasta aquellas con endemicidad similar y síntomas febriles como malaria, rickettsiosis, dengue y fiebre amarilla. Si existe sintomatología pulmonar debe descartarse la infección por hantavirus (Bharti et al., 2003).

A partir de la sospecha de leptospirosis en base a la evaluación clínica de un paciente, existen métodos diagnósticos que asisten a la confirmación de la enfermedad. La misma es usualmente diagnosticada en el laboratorio mediante el cultivo de la bacteria a partir muestras de sangre, orina o tejidos, la detección de anticuerpos (serodiagnóstico), o por la demostración de la presencia de leptospiras en los tejidos aplicando las técnicas de inmunofluorescencia, PCR ó PCR en tiempo real.

El aislamiento de leptospiras depende del material elegido y la etapa de la enfermedad. Durante la fase leptospirémica (desde el día 1 hasta alrededor del día 10 posterior a la presentación de los síntomas) el material más apropiado es la sangre. Por otro lado, las leptospiras pueden observarse con microscopio de campo oscuro y aislarse a partir de líquido cefalorraquídeo en medio semisólido durante las primeras semanas de la enfermedad. Durante la fase de leptospiuria, caracterizada por un incremento en la concentración de anticuerpos, (una semana después de la presentación de los síntomas) la orina y el cortex renal post mortem son los inóculos más apropiados para el aislamiento de leptospiras en los humanos. Animales silvestres y domésticos en el estado de portadores pueden liberar leptospiras intermitentemente por muchos años o incluso por toda la vida, durante el cual las leptospiras pueden ser aisladas de su orina o tejido renal.

Dado que los métodos para la detección directa de leptospiras son lentos o de limitada confiabilidad la serología es, en general, el método de diagnóstico más adecuado en caso de

sospecha de leptospirosis. La técnica de Microaglutinación (MAT) se basa en la antigua prueba de lisis aglutinación desarrollada por Martín y Petit (1918) y modificada posteriormente (Borg-Petersen y Fargroeus, 1949; Carbrey, 1960; Cole et al., 1973; Postic et al., 2000, Schüffner y Mohtar, 1926; Watt et al., 1988; Wolf, 1954). El método es simple y consiste en enfrentar al suero del paciente con leptospiras cultivadas, para luego evaluar el grado de aglutinación utilizando un microscopio de campo oscuro. De acuerdo con el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira*, el punto de corte se define como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación, dejado 50% de células libres, cuando se lo compara con un control que consiste de cultivo diluido 1:2 en *buffer* fosfato salino (Comité Internacional sobre Bacteriología Sistemática, 1984). La MAT permanece como prueba de referencia y es utilizada para la detección de anticuerpos y la determinación de su título. Esta prueba puede ofrecer una indicación del serogrupo al que pertenece el serovar infectante. La MAT detecta tanto los anticuerpos tipo IgM como IgG. La prueba no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación (Borg-Petersen y Fargroeus, 1949; Carbrey, 1960).

No obstante, este método no permite diferenciar si la presencia de anticuerpos se debe a una infección en curso, una infección crónica o a la inmunización del individuo mediante la aplicación de profilaxis (vacunación). Además, sólo los laboratorios especializados pueden realizarla dado que es necesario contar con una colección de cultivos de diferentes especies y serogrupos con los cuales poder evaluar la aglutinación de los sueros de los pacientes. Asimismo existen otras pruebas serológicas más sencillas y estandarizables que MAT, pero con menor especificidad para el diagnóstico de la leptospirosis. La técnica inmunoenzimática ELISA es útil para un diagnóstico más temprano y suele utilizarse ante cuadros inespecíficos. Puede detectar infecciones recientes, es sensible y tiene buena concordancia con MAT. Sin embargo, al utilizar anticuerpos género específicos no permite el conocimiento del serogrupo o serovar. Otros ensayos que permiten un rastreo rápido de anticuerpos contra leptospiras incluyen el test de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) y la hemaglutinación indirecta (IHA), pero cuentan con menor sensibilidad y deben ser confirmados por MAT (OMS, 2008).

Las leptospiras pueden también detectarse en forma directa en la orina, sangre o tejidos realizando cultivos, o por microscopía de campos oscuros, inmunofluorescencia indirecta e inmunohistoquímica (Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003). Los cultivos crecen muy lentamente, por

eso sólo pueden reportarse como negativos después de un mínimo de 6-8 semanas si no se ha observado crecimiento.

Por último, los métodos de diagnóstico molecular tienen el potencial de generar un gran impacto en el diagnóstico de la leptospirosis. La amplificación por PCR permite detectar el ADN de *Leptospira* spp. con una alta especificidad, pudiendo confirmar la infección tempranamente. La amplificación de fragmentos del ADN de la bacteria puede realizarse a partir de muestras clínicas como sangre, orina y otros fluidos como el cerebrospinal y el humor acuoso, donde los títulos de anticuerpos pueden ser menores y aparecer más tarde que en el suero. Se han descrito diversos protocolos de PCR, siendo los blancos principales el gen *rrs* (Merián et al., 1992, 1995) que codifica para el ARN ribosomal 16S, y el gen *lipL32* presente sólo en leptospirosis patógenas (Levett et al., 2005). La amplificación de *lipL32* por PCR en tiempo real permite confirmar la presencia de leptospirosis patógenas en la muestra, y en el caso de *rrs*, su amplificación y posterior secuenciación permite el conocimiento de la especie infectante. No obstante, la sensibilidad de estos métodos es altamente afectada por la calidad del material de partida. Pueden obtenerse falsos negativos debidos a la variabilidad en la calidad y concentración del ADN en las muestras clínicas examinadas, como también la presencia de inhibidores.

Debido a la variedad de estrategias disponibles y a sus diferentes aplicaciones que aún siguen siendo evaluadas, no se ha establecido un protocolo de PCR generalizado para el diagnóstico de leptospirosis.

3.4 Tratamiento de Leptospirosis

El tratamiento de esta enfermedad varía dependiendo de la severidad y duración de los síntomas. Los pacientes con sintomatología similar a una gripe, requieren solamente el tratamiento de dichos síntomas pero deben recurrir a una atención más exhaustiva en caso de desarrollar ictericia. Los pacientes que desarrollen leptospirosis anictérica requerirán de hospitalización y en estos casos puede recomendarse una punción lumbar si el dolor de cabeza es particularmente severo.

El manejo de la leptospirosis ictericia requiere de la admisión del paciente en unidades de cuidado intensivo. La hidratación parenteral es la base del tratamiento en especial en pacientes con shock

donde la rehidratación debe ser agresiva y la deshidratación debe ser corregida en 6 a 24 horas. En este tipo de paciente se debe controlar la función renal y en caso de falla se deberá proceder a la diálisis de manera inmediata (Dupont et al., 1997)

El administración de antibióticos ha demostrado ser la estrategia más efectiva contra esta enfermedad, si bien existen pocos estudios bien diseñados y controlados (Guidugli et al., 2000). La mayor dificultad en lograr la eficacia de un tratamiento antibiótico, radica en la presentación tardía de los pacientes a la consulta dando lugar a que las leptospiras se localicen en los tejidos. Estudios basados en la administración de doxiciclina (100 mg dos veces al día durante 7 días) demostraron la reducción de la duración y severidad de la enfermedad en leptospirosis anictérica en un promedio de 2 días (McClain et al., 1984). Un hallazgo importante de los estudios basados en doxiciclina es que se pudo prevenir la leptospiuria o al menos disminuir su tiempo de duración. Estos resultados *per se* justifican el empleo de este antibiótico en el tratamiento.

3.5 Profilaxis

Argentina carece de campañas de control en leptospirosis, tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal. Esta situación coloca al país en desventaja respecto de otros países como Australia o Nueva Zelanda, particularmente respecto de la colocación de los productos derivados de la producción ganadera en el mercado internacional. Si bien en la provincia de Entre Ríos en el año 2008 se implementó un plan piloto de vacunación, utilizando una vacuna trivalente de origen cubano que benefició a una población “foco de riesgo” de alrededor de 5000 personas (Elizalde, 2008), ésta no confiere protección contra los distintos serovares circulantes. En Sanidad Animal, la vacuna que se aplica en nuestro país es multivalente y, al igual que en el caso de humanos, la protección es restringida (CCLA, 2006). Las vacunas comerciales contra leptospirosis canina, bovina y porcina, disponibles en distintos países han mostrado ser parcialmente efectivas debido a la generación de inmunidad serovar específica (Srivastava, 2006). Dichas vacunas se basan en preparaciones de bacterias inactivadas o en preparaciones de membrana provenientes de leptospiras patógenas y confieren respuestas protectoras mediante la inducción de anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira*. A pesar de ello, estas vacunas han demostrado no ser efectivas a largo plazo en lo que se refiere a la inducción de una memoria inmunológica protectora, y a su vez no proveen protección contra los distintos serovares. Por otra parte se ha

observado que en algunos casos tanto en humanos como en equinos vacunados, la vacunación podría inducir autoinmunidad (Srivastava, 2006). En nuestro país se detectan principalmente, abortos bovinos como consecuencia de la infección por *L. interrogans* serovar Pomona y *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis (Seijo et al., 2002). Es por ello que una campaña de vacunación eficiente requiere la realización de estudios epidemiológicos para determinar la magnitud del problema y a su vez conocer las distintas serovariedades que circulan en una determinada región.

3.6 Epidemiología de la Leptospirosis

La leptospirosis es probablemente la enfermedad zoonótica con la mayor distribución geográfica a nivel mundial (Levett, 2001). Sin embargo, su incidencia es más alta en regiones tropicales que en zonas templadas, ya que las condiciones climáticas y socioeconómicas que allí confluyen proveen un entorno que promueve el mantenimiento en el ambiente y la transmisión de las leptospiras.

Se distinguen diferentes patrones epidemiológicos para la leptospirosis: endémica, epidémica, urbana o esporádica, por riesgo ocupacional y una variante más nueva asociada a la exposición durante actividades recreativas (Faine et al., 1999, Monahan et al., 2009).

Las áreas tropicales y subtropicales de Latinoamérica y el sudeste de Asia constituyen regiones endémicas, y aunque la aparición de casos ocurre durante todo el año puede además estar asociada a la estacionalidad del clima, incrementándose con el aumento de las lluvias y la temperatura. En estas regiones, las actividades cotidianas suelen estar ligadas a ambientes contaminados y propiciar la transmisión. Dado que la exposición de las personas a las leptospiras ocurre en mayor o menor grado, en las zonas endémicas son frecuentes las infecciones asintomáticas y los síndromes gripales leves.

En cambio, las leptospirosis de tipo epidémico surge en diferentes entornos, tanto endémicos como zonas templadas y en países desarrollados. En casos de epidemias urbanas, los brotes de leptospirosis son más frecuentes en los asentamientos urbanos periféricos, donde es mayor el riesgo de transmisión ya que se concentra la ocupación humana y abundan los roedores que

contribuyen al mantenimiento de las bacterias. Los casos esporádicos de leptospirosis que ocurren en países desarrollados están más bien asociados a la población indigente o marginada.

Asimismo, la leptospirosis endémica y epidémica pueden ocurrir en forma simultánea, por ejemplo luego de períodos largos de lluvia que acarrear inundaciones y otras catástrofes que contribuyen a la desorganización urbana, a la acumulación de basura y el incremento del contacto con aguas contaminadas.

La exposición ocupacional, tradicionalmente constituía un importante factor de riesgo para contraer leptospirosis, y estaba asociada a actividades como la minería, ganadería, veterinaria, mantenimiento de cloacas, trabajo en arrozales, actividades militares y otras. En la actualidad el riesgo de estas actividades ha disminuido ya que, especialmente en países desarrollados, se han implementado medidas de prevención que limitan la exposición. Sin embargo, en ambientes tropicales todavía es importante este tipo de exposición, en un contexto donde las medidas sanitarias son deficientes.

En los últimos años se ha vuelto significativa la aparición de brotes luego de eventos recreativos, especialmente los que involucran la inmersión en agua, como también el contagio de viajeros durante actividades de turismo aventura en zonas endémicas (Monahan et al., 2009).

La persistencia de las leptospiras en el ambiente se debe en gran medida a su capacidad de infectar una amplia variedad de animales, principalmente mamíferos, que incluyen desde especies salvajes hasta domésticas, como el ganado y las mascotas. Se han descrito una infinidad de animales con serología positiva a *Leptospira*, incluyendo mamíferos marinos (Zuerner y Alt, 2009), anfibios y reptiles (Ko et al., 2009).

Se considera como hospedador de mantenimiento a aquel que asegura la perpetuación de una población determinada de agentes infecciosos, actuando como reservorio continuo de un serovar, en un ecosistema determinado (Little, 1986). Dependiendo de la especie, la infección puede generar una enfermedad aguda o establecerse en forma crónica en los túbulo renales, como sucede en los hospedadores de mantenimiento o reservorios (Figura 6). Los roedores constituyen el reservorio primario para el mantenimiento del ciclo de transmisión, dado que cursan una infección crónica asintomática, con excreción de bacterias por orina durante toda su vida. Además,

otros hospedadores sin ser estrictamente reservorios pueden sufrir patologías intermedias entre la aguda y la crónica, y son capaces de liberar leptospiras en su orina por períodos variables.

Los humanos desarrollan una enfermedad aguda, y el contagio puede ocurrir en forma directa mediante el contacto con orina de animales infectados, o indirectamente a través de suelo o agua contaminados, siendo ésta la causa de contagio más frecuente (Figura 6). La transmisión de la bacteria por la vía indirecta es posible dada la capacidad que poseen algunas leptospiras de sobrevivir por largos períodos de tiempo en suelos húmedos y en el agua, en pH ligeramente alcalino y temperaturas cercanas a los 30 °C. De esta manera se incrementa la probabilidad de entrar en contacto con hospedadores. La entrada de la bacteria se produce a través del contacto de la piel con pequeñas heridas, o a través de las mucosas (ojos, boca, etc.) (Bharti et al., 2003).

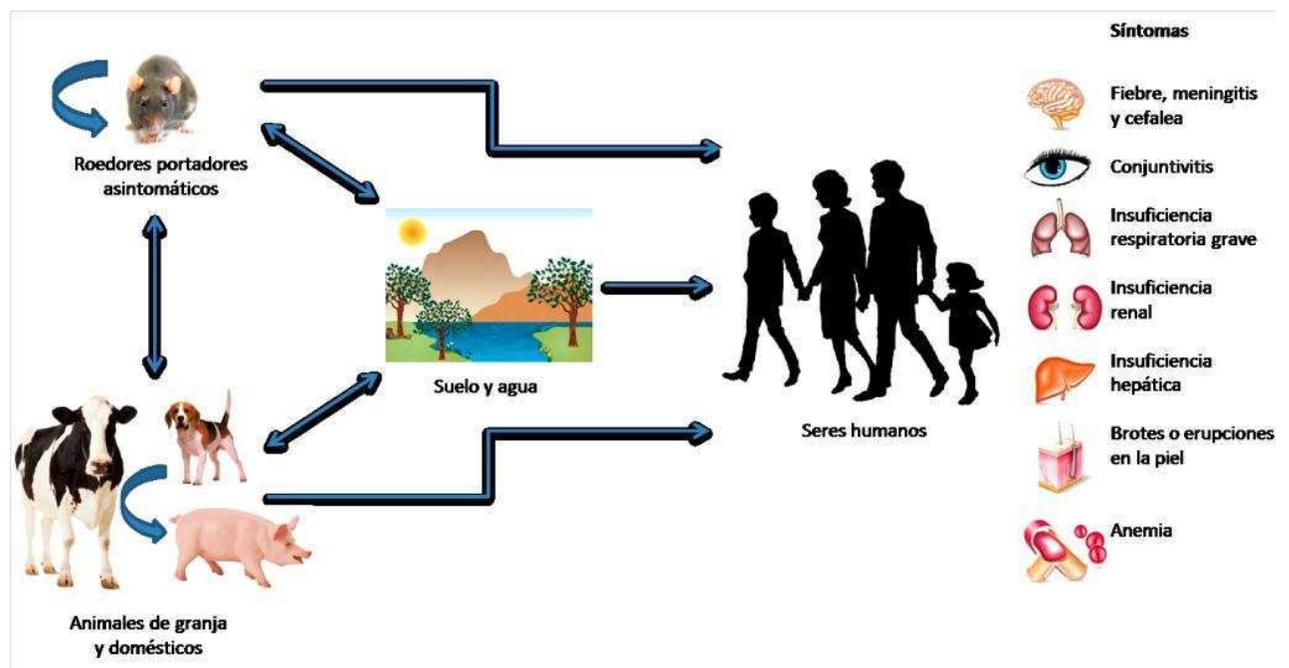


Figura 6. Ciclo de transmisión de *Leptospira*. Las leptospiras pueden infectar a los animales silvestres y domésticos, y causar diferentes manifestaciones clínicas y estados portadores. Los mamíferos, principalmente los roedores, liberan leptospiras en su orina. Otros animales y el hombre pueden contagiarse por contacto directo o por exposición agua o suelos contaminados su orina. La bacteria ingresa por piel o mucosas, y produce una gran variedad de síntomas (Adaptada de Ko et al., 2009).

Aún cuando los serovares circulantes en un ambiente son dependientes de la localización geográfica y la ecología de los reservorios locales, se han observado algunas asociaciones

recurrentes entre hospedadores y serovares (Bharti e al., 2003). Una de ellas es la que se observa entre roedores del género *Rattus* y el serovar Icterohaemorrhagiae, entre ratones (género *Mus*) y serovares pertenecientes al serogrupo Ballum (Tabla 3). Entre los animales domésticos, los perros suelen asociarse al serovar Canicola, y los bovinos al serovar Hardjo (Levett, 2001).

La prevalencia de serovares en las poblaciones humanas también es dependiente del tipo de reservorio presente y de los serovares portados por el mismo. Por ejemplo, los serovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, frecuentes en ratas, son generalmente los responsables de las infecciones humanas en Europa, mientras que en el sudeste de Asia es más frecuente el serovar Lai (Levett, 2001). Si bien no se han encontrado asociaciones marcadas entre serovares y manifestaciones clínicas, se ha observado frecuentemente leptospirosis severa causada por serovares del serogrupo Icterohaemorrhagiae (Picardeau, 2013).

Tabla 3. Hospedadores más comúnmente asociados a algunos serovares de *Leptospira*. (Reproducido de Bharti et al., 2003)

Hospedador	Serovar/es
Cerdos	Pomona, Tarassovi
Bovinos	Harjo, Pomona
Caballos	Bratislava
Perros	Canicola
Ovejas	Hardjo
Mapaches	Grippotyphosa
Ratas	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Ratones	Ballum, Arborea, Bim
Marsupiales	Grippotyphosa
Murciélagos	Cynopteri, Wolfii

Distintos informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconocen a la leptospirosis como una enfermedad emergente como consecuencia de los fenómenos climáticos extremos cada vez más frecuentes, y el crecimiento demográfico, que trae un aumento de los asentamientos urbanos periféricos a las ciudades. Sin embargo, la información epidemiológica tanto para humanos como

animales sigue siendo escasa, y no hay un conocimiento adecuado de los serovares circulantes en cada población. Recientemente la OMS estableció un Grupo de Referencia en Epidemiología e Impacto de la Leptospirosis (Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group, LERG), el cual en 2011 estimó una morbilidad global de leptospirosis endémica de 5 casos cada 100000 personas, reconociendo que es una subestimación porque sólo incluye los casos severos y escasamente notificados, y no incluye a la leptospirosis epidémica (LERG, 2011). En este contexto, la generación de información epidemiológica precisa es crucial, no solo para obtener una mejor estimación de la situación epidemiológica actual sino también para la adecuación de las pruebas diagnósticas y el desarrollo de nuevas vacunas.

3.6.1 Leptospirosis en animales de producción y domésticos

Además de constituir un problema para la salud humana, la leptospirosis es una enfermedad que reviste importancia a nivel veterinario, y debido a que afecta a animales de explotación produce pérdidas económicas, tanto por los casos fatales como por problemas reproductivos. En los animales domésticos y el ganado las manifestaciones clínicas de la leptospirosis pueden variar desde una infección aguda o subaguda a una infección crónica. Por lo tanto, dependiendo de la especie afectada y el serovar infectante, pueden producirse procesos patogénicos intermedios e incluir un estado portador de duración variable. La infección crónica se localiza en los riñones (eventualmente también en el tracto genital), en muchos casos sin evidencia clínica detectable de la enfermedad (OMS, 2008). Algunas especies de animales pueden funcionar como hospedadores de mantenimiento de serovares específicos que generalmente son endémicos en la región, y que se sospecha que inducirían una infección crónica (Guía OIE, 2014). Este sería el caso del serovar Hardjo asociado a bovinos en el continente Europeo (Guía OIE, 2014), o el serovar Canicola en perros (Alonso-Andicoberry, 2001). Sin embargo, al infectarse con otros serovares que son mantenidos por especies diferentes en el mismo ambiente, estos animales pueden sufrir una enfermedad aguda.

En el ganado bovino, la leptospirosis aguda suele detectarse por la disminución repentina en la producción de leche, la presencia de ictericia, meningitis, nefritis aguda o abortos. En animales jóvenes puede ocurrir un síndrome icterohemorrágico potencialmente fatal. La manifestación crónica en bovinos y porcinos puede llevar a problemas reproductivos, como infertilidad, abortos, mortalidad del feto o natalidad prematura. (OMS, 2008, Guía OIE, 2014). En ambos casos los

efectos sobre la reproducción bovina acarrear pérdidas económicas para el productor (Ellis, 1994, Scialfa et al., 2010). Además, los animales con infección crónica pueden ser portadores renales por años, contaminando suelos húmedos (madrigueras, corrales o bebederos) y así actuar como reservorios de la infección para otros humanos y animales que estén en contacto con dicho ambiente

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en perros son variables al igual que en otras especies, y pueden fluctuar desde una carencia total de síntomas, estado de portador renal (el cuál es el más común), hasta una enfermedad severa con falla renal aguda. Cachorros no vacunados sufren de las formas más severas de la enfermedad, algunas veces con desenlace fatal (OMS, 2008).

3.6.2 Situación epidemiológica en Argentina

En la República Argentina, la leptospirosis ha causado numerosos brotes y epidemias. No obstante, los datos sobre las características epidemiológicas y el impacto de la leptospirosis aún son escasos. Los brotes más importantes ocurridos en nuestro país fueron en 1976 (Buenos Aires), 1998 (Santa Fe), 2003 (Santa Fe) y 2007 (Santa Fe y Entre Ríos); éste último ha sido el de mayor impacto, informándose más de 700 casos. Más recientemente, en los primeros 2 meses del año 2010 se informaron 32 casos en la provincia de Santa Fe, 6 de los cuales resultaron fatales.

La mayoría de los casos de leptospirosis ocurren en períodos de lluvias e inundaciones, durante los meses cálidos y húmedos del año. Entre los años 1999 y 2005 se llevó a cabo un estudio analítico para identificar serogrupos y factores de riesgos asociados a los casos confirmados (Vanasco et al., 2008). En el mismo se evidenció que individuos con ocupación rural, contacto con aguas contaminadas e inundaciones tenían mayor riesgo de contraer la enfermedad (Vanasco et al., 2008). Al mismo tiempo, se identificó como el serogrupo de mayor prevalencia en las muestras analizadas a *Icterohaemorrhagiae* (31 %), que ya se había señalado como el más importante hace más de 30 años (Caccione et al., 1980). Le siguieron en orden de prevalencia los serogrupos *Pomona* (14.4 %) , *Ballum* (13,7 %) y *Canicola*.

Aunque el serogrupo *Icterohaemorrhagiae* es frecuentemente aislado de ratas, en Argentina se lo encontró en perros, caballos, ovejas y cerdos (AAVLD, 2002). En cuanto a *Pomona* (el segundo en

importancia), se asocia comúnmente a cerdos y bovinos (Caccione et al., 1980, AAVLD, 2002), mientras que Ballum se asocia a roedores urbanos (Vanasco et al., 2003).

Los hospedadores mencionados a su vez pueden constituir reservorios para otros serogrupos de leptospiras. En Buenos Aires, el 25-40% de las ratas y el 10-60% de los perros son seropositivos para *Leptospira* spp., principalmente a los serovares Canicola y Pyrogenes (Vanasco et al., 2008).

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la vigilancia epidemiológica a nivel nacional y hay varias provincias que han mejorado la búsqueda y detección de casos. La mayoría de éstos se concentran actualmente en las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires. Sin embargo estos datos son aún parciales, siendo la tasa de morbilidad/mortalidad desconocida. Aunque en general los brotes estuvieron ligados a la ocurrencia de inundaciones en estas zonas, también es donde se cuenta con mayor disponibilidad de laboratorios diagnósticos. Un logro muy importante en este sentido fue la creación de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL), cuyos objetivos son brindar un diagnóstico oportuno, de calidad, y colaborar con la vigilancia epidemiológica de la zoonosis a nivel nacional. No obstante, aún persiste la falta de herramientas sencillas y generalizadas para el diagnóstico, lo cual ha sido una de las principales barreras para conocer el real impacto de esta zoonosis en nuestro país y poder generar respuestas efectivas de salud pública.

3.7 Epidemiología molecular de *Leptospira*

La epidemiología molecular brinda herramientas para identificar, caracterizar y rastrear entidades biológicas de un patógeno (ej. especies, subespecies, cepas, clones), utilizando la tecnología molecular y el conocimiento en biología evolutiva. Los conocimientos así generados permiten evaluar el impacto de la diversidad genética del patógeno en sus propiedades epidemiológicas relevantes (Tibayrenc, 2009). En éste área se han desarrollado diferentes métodos que permiten la diferenciación y la clasificación de las cepas de *Leptospira*.

En lo que refiere a la caracterización (en sentido amplio) de aislamientos de leptospiras, existen diferentes estrategias para llevar adelante este propósito. La caracterización tradicional es la de tipo serológico, que surgió con anterioridad a los métodos de tipificación molecular y en la

actualidad aún se utiliza. Las técnicas serológicas tienen alta especificidad, y se establecieron fuertemente en el ámbito clínico y epidemiológico. La prueba de microaglutinación (MAT) permite el conocimiento del serogrupo, mientras que la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) es el ensayo estándar para la determinación del serovar (Dikken y Kmety, 1978). Si bien estas técnicas son muy útiles, su aplicación es compleja y son escasos los laboratorios que reúnen las capacidades para realizarlas adecuadamente. Es por eso que están limitadas a laboratorios de referencia con personal técnico especializado. En el caso de MAT, para poder realizar una caracterización adecuada requiere del conocimiento de los serovares/serogrupos de circulación local, pues éstos deben estar representados en el panel de antígenos ó antisueros al que se enfrentará una muestra clínica o aislamiento respectivamente. En general su especificidad sólo alcanza el nivel de serogrupo, información que es importante pero no suficiente en términos epidemiológicos. El conocimiento del serogrupo o serovar puede ayudar a la identificación de reservorios pero no permite la determinación del origen o el seguimiento de un brote. Tampoco es certera en cuanto a la especie de *Leptospira* infectante, pues como se mencionó previamente los serovares pueden presentarse en diferentes especies. Pese a estas limitaciones, MAT es aún una técnica ampliamente utilizada, y se encuentra difundida entre los profesionales del área clínica como médicos y veterinarios, en contraste con las metodologías moleculares. Su principal importancia radica en la información que brinda tendiente al desarrollo de vacunas que protejan contra los serovares locales. La prueba de CAAT está aún más restringida y menos generalizada que MAT, además existen algunas técnicas moleculares que permiten la determinación del serovar, aunque con menor especificidad.

La necesidad de contar con técnicas más sencillas y generalizadas para la clasificación de cepas que permitan el estudio epidemiológico de las mismas, ha llevado a diversos grupos a trabajar en el desarrollo de metodologías de tipificación molecular para el género *Leptospira*. Es por esto que durante los últimos años se han desarrollado métodos moleculares para su identificación y tipificación. Entre ellos se encuentran: la restricción de ADN cromosomal por endonucleasas (REA) (Brown y Levett, 1997), los polimorfismos en el largo de fragmentos de restricción (RFLP) (Zuerner et al., 1993a), la electroforesis en gel de campo pulsado (PGFE) (Herrmann et al., 1992) y distintos enfoques basados en la técnica de PCR, por ejemplo *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphisms* (FAFLP) (Nalam et al., 2010) y *Arbitrarily Primed PCR* (AP-PCR) (Perolat et al., 1994)

Estos métodos se basan en los mecanismos genéticos que dan lugar a la generación de polimorfismos en los genomas, y aunque la tipificación molecular no correlaciona necesariamente con la serológica, en determinados casos los serovares pueden ser caracterizados parcialmente. A pesar de ser sumamente útiles, estas técnicas presentan desventajas tales como la necesidad de contar con gran cantidad de ADN purificado de alta calidad, su poca reproducibilidad y poder discriminatorio, y a su vez presentan problemas asociados a la interpretación de los datos y la transferencia de resultados entre laboratorios (Slack et al., 2005).

El desarrollo en el campo de la genómica, y en particular para el género *Leptospira* con la secuenciación inicial de seis cepas de dos especies patógenas y una especie saprófita (Ren et al., 2003; Nascimento et al., 2004; Bulach et al., 2006; Picardeau et al., 2008), ha permitido el diseño de metodologías de tipificación basadas en PCR más precisas, orientadas a diferentes regiones del genoma. Las técnicas *Multilocus Variable Number of Tandem Repeats* (MLVA) y *Multilocus Sequence Typing* (MLST) se destacan entre las primeras aproximaciones basadas en secuencias genómicas con perspectivas promisorias en campo de la epidemiología molecular de *Leptospira*.

3.7.1 Identificación de especie mediante el gen 16S ARNr.

Para la identificación de bacterias al nivel de género y especie, la metodología molecular más ampliamente utilizada en la actualidad es el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr (Clarridge et al., 2004). La elección de este gen reside en que en su secuencia está altamente conservada en el genoma, probablemente a causa de producir un componente crítico para la función celular. Su grado de conservación lo convierte en un adecuado candidato para el uso en taxonomía ya que permite establecer la distancia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre organismos. El gen 16S ARNr es universal en bacterias, su secuencia posee un tamaño aproximado de 1500 pares de bases, y se compone de regiones variables y conservadas, conteniendo polimorfismos interespecíficos. La creciente disponibilidad de tecnologías de secuenciación y la reducción en los costos ha facilitado la implementación de este método.

Numerosos estudios han aplicado esta metodología para la identificación de especies dentro de la familia Leptospiraceae (Hookey et al., 1993; Postic et al., 2000; Morey et al., 2006). Los genomas de *Leptospira* contienen dos genes 16S ARNr que se encuentran en el cromosoma I (Ren et al., 2003; Nascimento et al., 2004).

La amplificación del gen puede realizarse mediante *primers* universales, diseñados para complementar las regiones conservadas en el comienzo y fin del gen, que amplifican la totalidad de la secuencia (Weisburg et al. 1991), o utilizando *primers* específicos para amplificar regiones variables (Mérien et al., 1992). La secuenciación bidireccional (de ambas hebras) permite una mayor consistencia en la resolución de bases. Al obtener las secuencias, se realiza una búsqueda de coincidencias en bases de datos públicas generales como GenBank (mediante la herramienta BLAST) o bien a través de bases de datos especializadas en secuencias de 16S, como Ribosomal Database Project (RDP-II) (Cole et al., 2009) o Greengenes (DeSantis et al., 2006). Las secuencias más recientes son de alta calidad, motivo por el cual, la secuenciación del gen 16S ARNr se ha convertido en una metodología precisa para la identificación de todas las especies de leptospiras descritas.

3.7.2 Multilocus Variable Number of Tandem Repeats (MLVA)

El MLVA se basa en el estudio de múltiples regiones del ADN (intra o intergénicas) cuya característica es que contienen secuencias repetitivas en tándem o "unidades variables de repeticiones en tándem" (VNTR por su nombre en inglés: *Variable Number of Tandem Repeats*). De acuerdo a la longitud de las secuencias repetitivas éstas se clasifican en elementos de tipo microsatélite (2-6 pares de bases -pb-) o de tipo minisatélite (unidades repetitivas de mayor longitud en un rango de 8 a 100 pb). Éstos pueden variar entre cepas o aislamientos tanto en el número de unidades repetitivas como en su secuencia primaria individual y longitud. Los VNTRs han sido identificados en esencialmente todas las especies procariontas y eucariotas y utilizados en forma exitosa como herramientas de identificación y estudio de su dinámica poblacional (King et al., 1997). Se ha demostrado para numerosos patógenos que la modificación de los genes a través de variaciones en las secuencias repetitivas ofrece ventajas evolutivas (Van Belkum et al., 1998). Además se ha informado que la metodología también tiene un alto poder discriminatorio entre cepas (Majed et al., 2005; Slack et al., 2005).

El MLVA consiste en una técnica sencilla y que requiere equipamiento de baja complejidad. Consta de la amplificación por PCR de las regiones que contienen las secuencias repetitivas y el análisis de dichos productos de amplificación mediante electroforesis horizontal (minisatélites) o vertical (microsatélites). El número de secuencias repetitivas se determina en base a los pesos moleculares

de los productos de amplificación obtenidos. Para cada loci se definen diferentes alelos en donde cada alelo indica que la secuencia básica varió en el número de repeticiones en una determinada cepa (Figura 7).

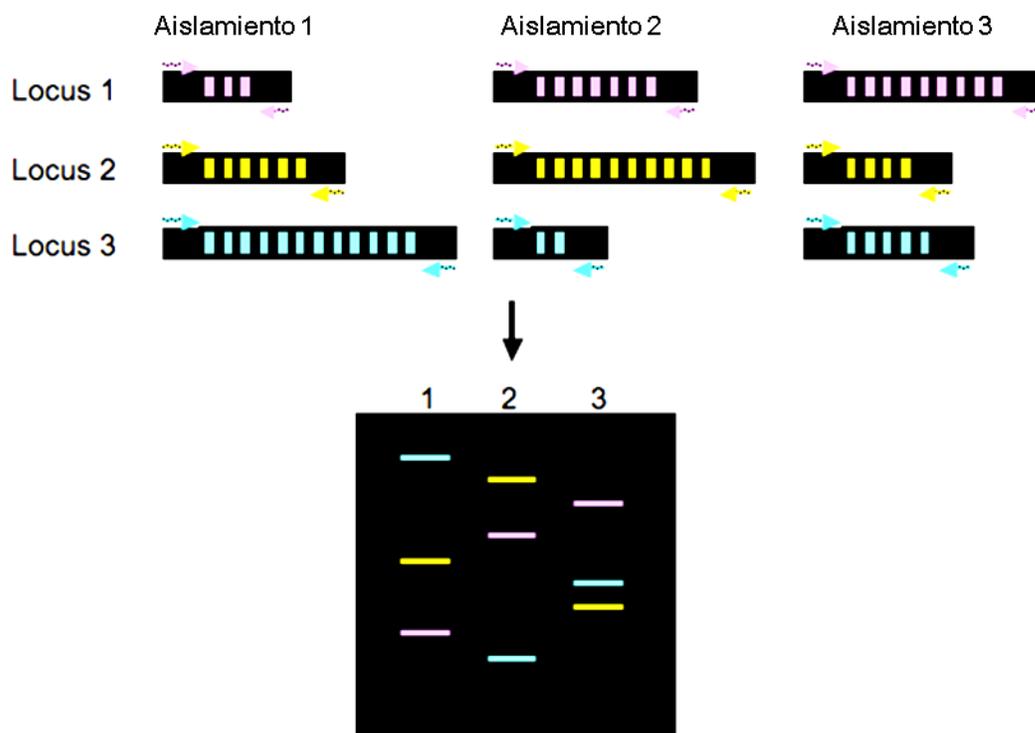


Figura 7. Esquema de la metodología de análisis por MLVA. Los aislamientos varían en el número de repeticiones por loci, el cual constituirá el alelo correspondiente. Se utilizan varios loci VNTRs para poder determinar un perfil alélico que permita diferenciar los aislamientos. Los productos de amplificación de los VNTRs se corren en un gel de agarosa, donde se separan por tamaño de acuerdo al número de repeticiones. Cada aislamiento mostrará un patrón particular.

El primer diseño de MLVA para el género *Leptospira* se obtuvo a partir de los primeros genomas disponibles de *Leptospira interrogans* (CITA). Su aplicación está limitada a las especies patógenas *L. interrogans* y la estrechamente relacionada *L. kirschneri* (Majed et al., 2005; Slack et al., 2005). Posteriormente, Salaun y col (2006) ampliaron la aplicación del MLVA a otra especie patógena importante, *L. borgpetersenii*. El esquema ampliado de 8 loci de Salaun y col. ha sido el más difundido hasta el presente (Salaun et al., 2006; Pavan et al., 2011) debido a que, a diferencia del esquema de cinco loci, permite la tipificación adicional de *L. borgpetersenii*, lo cual es de suma relevancia ya que esta especie es frecuentemente aislada de infecciones humanas y animales.

3.7.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

La estrategia de Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci o MLST (del inglés *Multilocus Sequence Typing*) se propuso en 1998 como una aproximación que proporcionara datos precisos y reproducibles, que fueran apropiados para la investigación epidemiológica de patógenos bacterianos y que también reflejaran su biología evolutiva y poblacional (Maiden et al., 1998). Desde entonces el MLST se ha convertido en una técnica líder entre los métodos de tipificación molecular, debido a su alto poder discriminatorio entre distintos aislamientos bacterianos, su fácil aplicación y estandarización, además de la posibilidad de transmitir la información obtenida en distintos laboratorios a través de bases de datos públicas. La metodología de MLST se basa en la amplificación por PCR y posterior secuenciación de 6 a 10 regiones génicas o loci cuya combinación determina un perfil alélico o *sequence type* (ST). El método permite generar datos basados en secuenciación para la tipificación de aislamientos, y asimismo es aplicable a estudios poblacionales y epidemiológicos (Figura 8).

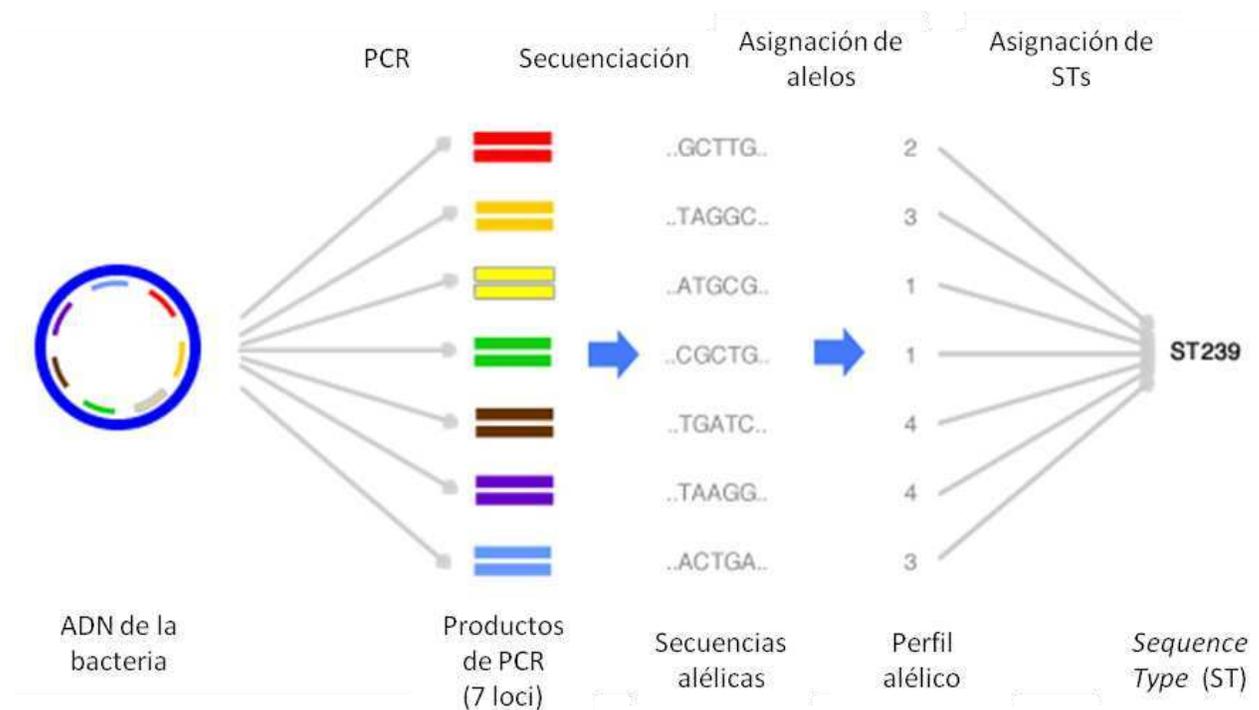


Figura 8. Esquema de la metodología de análisis por MLST. Los siete genes analizados se indican en colores. Las variantes alélicas son generadas por la presencia de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) entre dichas secuencias. El ST estaría representado por el perfil alélico establecido para un aislamiento (Adaptada de www.mlst.net).

Los *loci* que componen un esquema de MLST en general constituyen fragmentos de genes *housekeeping*, (codifican para proteínas que participan en rutas metabólicas) de copia única y distribuidos en el genoma. La característica fundamental de los genes target que componen un esquema de MLST es que se encuentren bajo presión de selección negativa. De esta manera, estos genes se encuentran bajo selección estabilizadora, su función es conservada y la variación en sus secuencias se produce principalmente por acumulación de sustituciones sinónimas. Por lo tanto poseen una evolución más lenta respecto de otros marcadores moleculares, y esto los caracteriza como excelentes marcadores evolutivos (Maiden et al., 1998, 2006). A diferencia de otras metodologías, el MLST se destaca por ser un método altamente eficiente para identificar relaciones de ancestría entre cepas, y también identificar o relacionar aislamientos asociados a un brote. El uso de múltiples loci distribuidos en el genoma resuelve las malas interpretaciones surgidas de la transferencia horizontal de ADN en la población de bacterias. Aún cuando alguno de los loci sufrieran recombinación, los aislamientos podrán vincularse a través de los restantes loci.

A partir del surgimiento del MLST, se desarrollaron tres esquemas diferentes para la tipificación de *Leptospira* (Ahmed et al. 2006; Thaipadungpanit et al. 2007; Leon et al. 2010). El primero (Ahmed et al. 2006) incluyó seis loci, distribuidos en tres genes *housekeeping*, dos loci codificantes para proteínas de membrana, y un fragmento del gen *rrs* que codifica para ARN ribosomal. La validación experimental de este esquema comprendió la tipificación de siete especies patógenas de *Leptospira*, y se aplicó a una colección de alrededor de 300 cepas. No obstante, las secuencias generadas no fueron publicadas en bases de datos ni se determinaron los perfiles alélicos correspondientes, aunque están disponibles a través de sus autores para el análisis offline. Posteriormente se desarrolló un segundo esquema seleccionando siete loci *housekeeping*, para el análisis de un brote de leptospirosis ocurrido en Tailandia en el año 2000 (Thaipadungpanit et al., 2007). Si bien el esquema se aplicó a 101 aislamientos y permitió corroborar la clonalidad de un genotipo predominante, su alcance se acotó a la tipificación de *L. interrogans* y *L. kirschneri*. No obstante, los autores dieron un paso al frente al incluir las secuencias generadas en una base de datos pública (<http://www.mlst.net>) de acceso en línea. El sitio permite tipificar e incluir nuevas secuencias, cuyos perfiles alélicos permanecen almacenados y ordenados, así como realizar distintos análisis incluyendo secuencias previas. La disponibilidad pública del esquema habilita la

comparación de perfiles entre aislamientos y cepas de todo el mundo entre los investigadores, pudiendo aplicar enfoques y análisis epidemiológicos globales. Más recientemente, en 2013, el esquema de siete loci fue rediseñado en base a los nuevos genomas de *Leptospira* disponibles (Boonsilp et al., 2013) de manera de incluir a las siete especies patógenas principales.

El tercer esquema de MLST desarrollado para *Leptospira* (León et al., 2010) comprendió otros siete loci housekeeping, a partir de la comparación entre dos genomas de *L. interrogans*. Sin embargo, su aplicación se realizó en un conjunto reducido de cepas (alrededor de 50), incluyendo solamente las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri* y no se ha generalizado su aplicación.

A partir de las características descritas, los esquemas de seis y siete loci desarrollados por Ahmed et al. (2006) y Thaipadungpanit et al. (2007, revisado por Boonsilp et al. en 2013) fueron los más elegidos por los investigadores del área para su aplicación a estudios de tipificación, principalmente por incluir a la mayoría de las especies patógenas, y a la disponibilidad pública de secuencias.

3.8 Genómica de *Leptospira*

Durante la última década se obtuvieron las secuencias genómicas completas para varias especies de *Leptospira*, las cuales revelaron características más detalladas sobre la composición genética en este género. Entre otras aplicaciones, esta información facilitó y permitió el desarrollo de métodos de tipificación. Las primeras secuencias publicadas y estudiadas correspondieron a los genomas de las especies patógenas *L. interrogans* serovar Lai (Ren et al., 2003), *L. interrogans* serovar Copenhageni (Nascimento et al., 2004), las secuencias de dos cepas serovar Hardjo bovis de *L. borgpetersenii* (Bulach et al., 2006) y la secuencia de la especie saprófita *Leptospira biflexa* (Picardeau et al., 2008).

Estos estudios determinaron que los genomas poseen entre 3.9 y 4.6 Mb y se distribuyen en dos cromosomas, con un contenido G+C que fluctúa entre el 35 y el 41%. Estos tamaños son aproximados ya que pueden variar levemente entre las diferentes especies (Tabla 4). En el genoma de *L. biflexa* se observó además la presencia de un replicón de 74 kb (Picardeau et al., 2008) (Figura 9). Los análisis comparativos entre los genomas brindaron indicios respecto de los factores

genéticos que influyen en los diferentes estilos de vida de las especies. En primer lugar, se han podido establecer importantes diferencias genéticas entre leptospirosis patógenas y saprófitas.

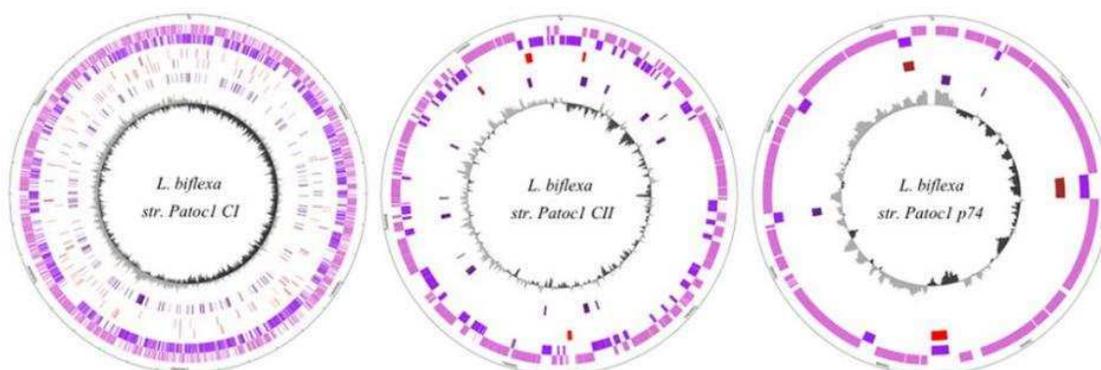


Figura 9. Mapas circulares de los tres replicones de *L. biflexa*. Color rosa oscuro: genes únicos para *L. biflexa*, no se encuentra en *L. interrogans* serovar Copenhageni y *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis. Color púrpura oscuro: genes que se encuentran en las tres especies. Imagen adaptada de Picardeau et al. (2008).

Los genomas de *L. interrogans* sv. Copenhageni y sv. Lai poseen un tamaño de 4.6 Mb (Nascimento et al., 2004; Ren et al., 2003). Por su parte, el genoma de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo resultó ser menor, con 3.9 Mb (Bulach et al., 2006). Se determinó que *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* contienen alrededor de 3400 y 2800 regiones codificantes predichas respectivamente (excluyendo elementos móviles como pseudogenes y transposasas), de las cuales alrededor de un 20 % son específicas de patógenas, ya que no se hallaron en la especie saprófita *L. biflexa* (Picardeau et al., 2008). Las funciones de la mayoría de estos genes es aún desconocida. Teniendo en cuenta la ausencia de homología con factores de virulencia de otras bacterias, esto sería un indicio de que *Leptospira* posee mecanismos de virulencia propios (Ko et al., 2009). Aunque entre *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* se encontraron más de 2000 genes compartidos, cada una retiene genes exclusivos (627 y 265 respectivamente) que no comparte con la otra especie patógena (Figura 10). Por otro lado, el análisis de *L. biflexa*, reveló la presencia de muchos más genes codificantes para funciones relacionadas a la adquisición de nutrientes y a la percepción del ambiente que en los genomas de las leptospirosis patógenas. Dichos genes están también presentes en el genoma de *L. interrogans*, lo que explicaría su alta tasa de transmisión a través del agua, al contrario de lo que ocurre con *L. borgpetersenii* que se ve restringida a sobrevivir dentro del hospedador,

disminuyendo su transmisibilidad (Bulach et al., 2006). Por su parte, debido al menor tamaño del genoma de *L. borgpetersenii* (3,9 Mb), éste presentó diferencias substanciales en el contenido genético y su organización. Entre ellas, se encontró una proporción mucho mayor de transposasas y pseudogenes (fragmentos de genes con secuencias de inserción) que para *L. interrogans* (20 % versus 2 %). En base a los hallazgos en los genomas y las diferencias conocidas en la transmisibilidad de estas especies, se sugirió que *L. borgpetersenii* estaría atravesando un proceso de reducción genómica y especialización. La pérdida de genes podría haber dañado su capacidad para sobrevivir fuera del hospedador, y su tendencia evolutiva se orientaría hacia la dependencia estricta de un ciclo de transmisión por contacto directo entre hospedadores (Bulach et al., 2006).

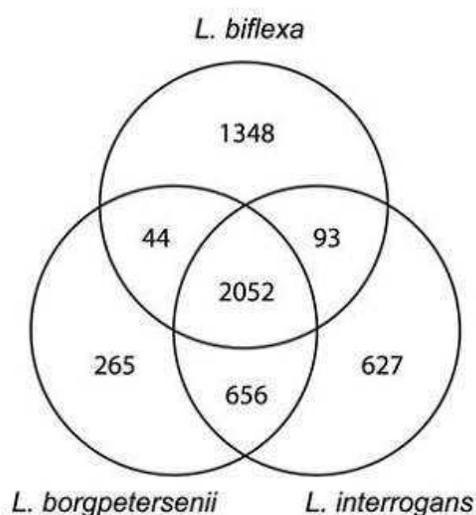


Figura 10. Diagrama de Venn mostrando el número de genes únicos y compartidos entre *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. biflexa*. Reproducida de Picardeau et al. (2008).

Tabla 4. Características genómicas principales de las leptospiras secuenciadas.

Patogenicidad	Supervivencia en el ambiente	Especie	Tamaño del genoma (Mb)	Regiones codificantes (CDS)	Pseudogenes	Transposasas
Patógeno estricto	No	<i>L. borgpetersenii</i>	3,93	2844	368	241
Patógeno	Sí	<i>L. interrogans</i>	4,6	3379	41	26
No patógeno	Sí, supervivencia y multiplicación	<i>L. biflexa</i>	3,96	3590	33	10

Asimismo, las comparaciones entre genomas indicaron que el genoma de *L. biflexa* es relativamente estable, mientras que los genomas de especies patógenas han sufrido diferentes rearrreglos, presumiblemente mediados por secuencias de inserción (Picardeau et al., 2008). Se ha mostrado que la plasticidad genómica es considerable, incluso dentro de la misma especie. Por ejemplo, cepas de una misma especie pueden diferenciarse por la aparición de una isla genómica (IG), o una inversión (Nascimento et al., 2004). Estas diferencias indicarían la ocurrencia de transferencia lateral de genes intraespecífica. El mosaico genómico observado entre cepas altamente relacionadas genéticamente tiene una implicancia al momento de establecer la relaciones filogenéticas, dado que sugiere que el contenido génico de las cepas y por ende su fenotipo, será más difícil de tipificar utilizando un número reducido de loci. En una de las IGs se hallaron diferencias en la presencia/ausencia de algunos de los genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis del antígeno O (componente del LPS), y coincidentemente las cepas en las que estas diferencias fueron observadas pertenecían a distintos serovares (Nascimento et al., 2004). Esta observación abre nuevos caminos en el desarrollo de métodos de tipificación basados en genes serovar-específicos. A su vez los genes cepa específicos hallados permiten contar con nuevas herramientas a evaluar relacionadas a la patogénesis de *Leptospira*, tendientes a la generación de nuevos métodos de diagnóstico.

Posteriormente al análisis de los 6 genomas iniciales, se obtuvo el de otra especie de *Leptospira* patógena, *L. santarosai* (Chou et al., 2012), y los genomas de dos cepas de la especie de patogenicidad intermedia, *L. licerasiae* (Ricaldi et al., 2012). Asimismo, se inició en 2010 un importante proyecto de secuenciación genómica de *Leptospira*, de alcance global, (*Leptospira* Genomics and Human Health) desarrollado por Joseph Vinetz y colaboradores (<http://gcid.jcvi.org/projects/gsc/leptospira/index.php>), a partir de la disponibilidad de metodologías de secuenciación de alto rendimiento.

Este proyecto abarcó la secuenciación de cepas de todas las especies del género *Leptospira* mediante una estrategia híbrida entre las tecnologías 454 e Illumina. Se incluyeron más de 300 cepas representativas de 20 especies, incluyendo patógenas y saprófitas, y a su vez cepas procedentes de muchos hospedadores y con distintas manifestaciones clínicas. La generación de las secuencias fue completada, aunque la mayoría se encuentra aún en formato “crudo” o en estadios intermedios de ensamblado. Actualmente éstas se encuentran depositadas y disponibles en GenBank.

A partir de la secuenciación de *L. licerasiasae*, se realizó una nueva comparación entre 8 genomas, que incluyen a las especies *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* (2 cepas de cada una). En este estudio se definió un genoma "core" (compartido entre las especies) de 1547 genes (Figura 11). Además, se determinó que 452 genes conservados se restringían a las especies patógenas, y que probablemente estarían relacionados a la virulencia. En este análisis también se encontró evidencia de transferencia horizontal en función del origen filogenético del antígeno O, y otros genes, que sugiere que *L. licerasiae* podría intercambiar material genético con otras bacterias ambientales no invasivas. En base al contenido funcional, los resultados indican que las leptospiras intermedias son más cercanas genéticamente a las patógenas que a las saprófitas (Ricaldi et al., 2012).

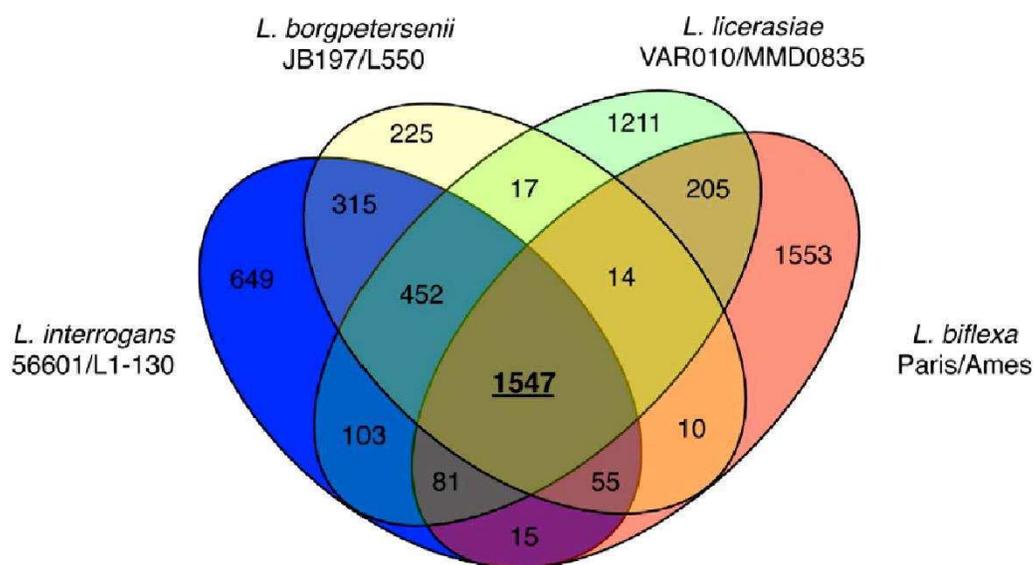


Figura 11. Diagrama de Venn mostrando la distribución de proteínas compartidas y únicas separadas por especies de *Leptospira*. Se utilizaron dos cepas de cada especie para estas comparaciones. Solamente se muestran las proteínas presentes en ambas cepas de una dada especie. Reproducido de Ricaldi et al. (2012).

En base a lo expuesto, se desprende que la tecnología de secuenciación genómica facilita la comparación de genomas completos, y puede ser aplicada no solo a cepas de referencia sino también a distintos aislamientos con el objeto de examinar la dinámica en la conservación génica y así poder establecer lazos genéticos entre cepas, lo que permitiría reforzar los datos obtenidos mediante los métodos de tipificación disponibles.

Hipótesis y Objetivos

4. Hipótesis

Hipótesis General

Las características genéticas particulares del género *Leptospira* pueden ser establecidas mediante técnicas de tipificación molecular y genómica comparativa, lo que permitirá profundizar el conocimiento de la epidemiología poblacional y evolutiva de este patógeno.

Hipótesis particulares

- 1- Los métodos de genotipificación permiten discriminar aislamientos de *Leptospira* spp. así como actualizar y profundizar en el conocimiento de la diversidad genética de las cepas circulantes en Argentina.
- 2- Mediante el estudio de la diversidad genética de los aislamientos en un contexto epidemiológico es posible la identificación de los genotipos de mayor impacto.
- 3- La disponibilidad de secuencias genómicas completas permitirá el desarrollo de nuevos marcadores adecuados a la situación epidemiológica local.

Objetivos

Objetivo General

Conocer la variabilidad genética de las especies patógenas del género *Leptospira* en Argentina mediante nuevas herramientas que permitan establecer la situación epidemiológica actual y que aporten información adecuada para su implementación en programas de control y métodos de diagnóstico de la Leptospirosis.

Objetivos Específicos

- 1- Tipificar aislamientos argentinos de *Leptospira* spp. y cepas de referencia provenientes de distintos hospedadores mediante las estrategias de MLST y MLVA.
- 2- Estudiar la composición de genotipos, analizando las relaciones filogenéticas entre los mismos, para dilucidar posibles conexiones epidemiológicas.
- 3- Comparar las estrategias de tipificación utilizadas a fin de optimizar el grupo de marcadores que mejor describa la variabilidad genética del género *Leptospira*.
- 4- Realizar estudios de epidemiología genómica comparativa a partir de la disponibilidad de nuevos genomas representativos de diferentes especies y regiones geográficas a escala global.

Materiales y Métodos

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas: características y procedencia

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron tanto cepas de referencia como aislamientos de diferentes especies de *Leptospira*. Si bien el término "cepa" puede utilizarse en forma generalizada para referirse a cultivos de una bacteria que no son clones, las cepas de referencia se definen como aquellas que están debidamente caracterizadas y catalogadas (origen, condiciones de cultivo, virulencia, resistencia a antibióticos, tipificación serológica) y que forman parte de colecciones de cultivos para su posterior estudio (van Belkum 2007). Por otro lado, los aislamientos consisten en cultivos de la bacteria generados a partir de casos clínicos ó muestras ambientales pero que aún no han sido caracterizados de manera exhaustiva.

De esta manera, fueron estudiados aislamientos del género *Leptospira* de diferentes regiones de la Argentina (no relacionados epidemiológicamente) provenientes de casos clínicos humanos y diferentes hospederos animales (principalmente de animales de producción como bovinos y porcinos) en el contexto de cepas de referencia mundiales.

Los aislamientos argentinos incluidos en este trabajo forman parte de las colecciones de tres de los principales laboratorios de referencia del país:

- Laboratorio de referencia de Leptospirosis del Instituto de Patobiología de INTA Castelar;
- Laboratorio de la empresa productora de vacunas veterinarias Biogénesis Bagó;
- Laboratorio de Leptospirosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de Santa Fe (INER-CONI), perteneciente a la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL).

En diferentes etapas del desarrollo de este trabajo se contó además con un número variable de datos sobre cepas previamente tipificadas o cuyos genomas fueran secuenciados y disponibles. Las cepas de referencia fueron analizadas "de novo" a partir de cultivos obtenidos de las colecciones mencionadas, o a partir de secuencias de regiones génicas obtenidas de bases de datos específicas, y secuencias genómicas de acceso público:

- <http://leptospira.mlst.net/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=leptospira>
- http://gcid.icvi.org/status.shtml?c_p=Leptospira_GSC

De esta manera la suma de cepas con las que se conto en este trabajo fue de 116 incluyendo 29 aislamientos Argentinos. En la Tabla 1 del Anexo se listan las cepas y aislamientos estudiados detallando, de estar disponible la información, el origen geográfico, el hospedero y la clasificación serológica. Dicha colección incluye 7 especies patógenas de *Leptospira*. Éstas fueron analizadas diferencialmente, según sus características y aplicabilidad a los diferentes métodos.

Para una etapa posterior del trabajo también se incorporaron para la tipificación 61 muestras clínicas provenientes de pacientes humanos. Dichas muestras se describen en la Tabla 2 del Anexo.

5.2. Cultivo de leptospiras

5.2.1 Medios de cultivo

Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido enriquecido (EMHJ) o semisólido (Fletcher). Los cultivos fueron mantenidos y repicados como se detalla a continuación.

5.2.1.1. Medio enriquecido EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris)

El medio enriquecido EMJH utilizado se compone del medio base EMJH (Difco, E.E.U.U.) combinado con un medio de enriquecimiento EMJH (Difco, E.E.U.U.). El medio base contiene cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, tiamina como factor de crecimiento, y posee capacidad de *buffer* provista por fosfato disódico y fosfato monobásico de potasio (pH $7,2 \pm 0,2$). Además contiene cloruro de sodio que aporta iones esenciales para el crecimiento. Éste se complementa con el medio de enriquecimiento EMJH que aporta albúmina, polisorbato-80 y factores de crecimiento adicionales para *Leptospira*, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Este medio se implementó para el crecimiento de cultivos líquidos en el presente trabajo. Para inhibir factores de contaminación se puede adicionar al medio 5-fluoroacilo (5-FU), una pirimidina fluorada que no afecta el crecimiento de *Leptospira*.

5.2.1.2. Medio semisólido Fletcher

El medio de cultivo de Fletcher es un medio semisólido enriquecido, y constituye uno de los medios más comúnmente empleados para el aislamiento a partir de muestras clínicas (orina, sangre, riñón, hígado), siendo también utilizado para el cultivo y mantenimiento de cepas de

referencia. Su composición consta de extracto de carne y peptona, los cuales proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas para apoyar el crecimiento bacteriano. Está enriquecido con suero de conejo, que refuerzan el crecimiento de leptospiras, y contiene una pequeña cantidad de agar, que provee una consistencia semisólida, adecuada para la detección de organismos móviles. En este tipo de medio las bacterias se concentran en una superficie denominada "zona de Dinger", donde la tensión superficial de oxígeno es óptima. La preparación de un medio selectivo se logra, al igual que el caso anterior, mediante la adición de 5-fluoroacilo (5-FU).

Los cultivos utilizados durante el trabajo se recibieron en medio semisólido Fletcher para luego ser repicados en medio líquido.

5.2.2. Seguimiento de cultivos y repiques

Los cultivos de partida se recibieron en medio semisólido Fletcher, con crecimiento bacteriano observable mediante anillo de Dinger. A partir de este cultivo inicial se realizaron repiques de cada cepa en medio líquido enriquecido EMJH, los cuales se incubaron en estufa a 28 °C durante un mínimo de 15 días, en aerobiosis y oscuridad. El crecimiento de los cultivos en medio líquido se evidenció por la aparición de turbidez. Posteriormente, para confirmar la presencia de leptospiras en el cultivo, descartar contaminaciones y confirmar la viabilidad, se realizó una tinción del mismo utilizando el reactivo LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes Inc., EEUU). Este *kit* permite distinguir bacterias vivas con membranas intactas (fluorescencia verde) de bacterias muertas con membranas dañadas (fluorescencia roja), ya que en este último caso las atraviesa.

5.3 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó a partir del cultivo líquido mediante un protocolo modificado del método estándar fenol/cloroformo/alcohol isoamílico con adición de proteinasa K. Para ello se partió de un cultivo a saturación y se colectaron 1,5 mL del mismo, realizando una centrifugación de 10 minutos a 12000 rpm. El precipitado se lavó con buffer fosfato salino (Phosphatebufferedsaline, PBS) estéril una ó dos veces consecutivas dependiendo de la abundancia del precipitado. A continuación se adicionó al precipitado 190 µL del *buffer* de lisis (Tris-Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), TE 50 mM, NaCl 100 uM, SodiumDodecylSulphate (SDS) 10 %, pH 7) y 10 µL de proteinasa K (Promega, E.E.U.U.) (10 mg/mL). Se mezcló por

agitación con vortex y se incubó 2 horas a 37 °C. Luego de la incubación se realizó la extracción propiamente dicha mediante la adición de 200 µL de cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 24:1, seguida de una centrifugación de 5 minutos a 12000 rpm para separar las fases. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio, y se descartó la fase orgánica. La precipitación se realizó mediante la adición de 0,6 volúmenes de isopropanol (respecto del volumen de fase acuosa) e incubando a -20° C hasta el día siguiente (*overnight*). El paso siguiente fue centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos, y a continuación el precipitado se lavó con 100 µL de etanol 70%. Se dejó evaporar el etanol y se resuspendió en agua estéril (20 µL).

El ADN genómico fue cuantificado mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific, E.E.U.U.) y conservado a -20 °C hasta su posterior utilización. Adicionalmente, se lo sometió a electroforesis en agarosa para observar su integridad, independientemente de la concentración determinada previamente.

5.4 Protocolos de amplificación por PCR

Durante el desarrollo del trabajo se llevó a cabo la caracterización de aislamientos mediante la aplicación de de diferentes marcadores moleculares basados en ampificación por PCR. En esta sección se detallarán las condiciones de reacción y las secuencias de los *primers* para cada grupo de marcadores . Más adelante se desarrollarán las características y objetivos de cada metodología. Todas las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, E.E.U.U.).

5.4.1. 16S ARNr para *Leptospira*

Los *primers* utilizados en la PCR para amplificar el locus 16S ARNr para la determinación de especie son específicos para amplificar un fragmento de 331 pares de bases del gen *rrs* para el género *Leptospira*, y fueron descritos originalmente por Merièn y col. (Merièn et al. 1992). La región amplificada comprende desde la base 38 a la base 368 de la estructura primaria del gen, y contiene dos regiones hipervariables (Chakravorty et al., 2007). Las secuencias de dichos *primers* y las condiciones de PCR se describen en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. *Primers* utilizados en la amplificación del gen *rrs* (16S ARNr).

Nombre	Secuencia nucleotídica
LA	5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'
LB	5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'

Tabla 2. Condiciones de amplificación de 16S ARNr.

Reactivos	Concentración final	Ciclado
Buffer 5X (Promega)	1X	94° C 3 min.
Deoxinucleósido trifosfato (dNTPs, Promega) 100 mM (25 mM c/u)	2 mM cada uno	54 °C 90 seg.
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Promega) 25 mM	2 mM	72° C 2 min. (1 ciclo)
Seroalbúmina bovina (BSA)	0,026 ug/μL	
<i>Primers</i> 12,5 uM	0,25 uM	94° C 1 min.
GoTaq DNA polymerase (Promega)	0,025 U/μL	54°C 90 seg.
ADN templado	10-50 ng (volumen variable)	72 °C 2 min. (29 ciclos)
Volumen final de la reacción = 50 μL		72° 10 min

La amplificación se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % utilizando buffer TAE 1X y revelados mediante tinción con GelRed (Biotium, E.E.U.U.).

5.4.2. MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*)

La tipificación de todos los aislamientos de la colección se realizó a través de 8 loci VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) descritos en un esquema de MLVA por Majed et al. (2005), para las especies *Leptospira interrogans* y *Leptospira kirschneri*. Los loci VNTR incluidos en el esquema fueron: 4, 7, 9, 10, 11, 19, 23 y 31. Los *primers* utilizados fueron los informados por los autores, con excepción de VNTR11a y VNTR9b, que fueron rediseñados en este estudio mediante la aplicación Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) para mejorar la eficiencia de amplificación. Las secuencias de los *primers* y las condiciones de amplificación se muestran en las Tabla 3.

Tabla 3. *Primers* utilizados en la amplificación de VNTRs

Nombre	Secuencia primer (5' - 3')	Ciclado
4a	CAAAATCAGTCACTACCCCTG	94° C 5 min.
4b	CTTTGTTGGAGCGCAATCTC	
7a	TCATCTGCTCCGGAGATTCG	94° C 30 seg.
7b	TCCCTCCACAGGTTGTCTTG	
9a	TCGCTCTACAGGTCGGTGTT	55° C 30 seg.
9b-bis	TCGCTCTRCAGGTCGGTGTT	
10a	TCCAAAATTCAGCCCTCAAG	72° C 1 min.
10b	GACGCTTGGCATTGTATCC	
11a-bis	CACAGGTCGGAATTTGTCT	(35 ciclos)
11b	CACAGGTCGGAATTTGTCA	
19a	CAGAAACAAGAGGGAAGATTC	70° C 10 min.
19b	ACTCTCATTTAAGAGTGGCTG	
23a	TTTCCAAATATACTTACTCGG	
23b	GCAAGAGAATTATTGGGATGG	
31a	TTCATGAAGGTCCCGAAAAC	
31b	ACGTGAGTTCGACCATGATTC	

La determinación de amplificación positiva de cada loci y su análisis posterior se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% revelados con GelRed (Biotium, E.E.U.U.).

5.4.3. MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

5.4.3.1. Esquemas de MLST

Existen 3 esquemas de MLST que constan de conjuntos de loci diferentes para la genotipificación de *Leptospira*. Los esquemas aplicados en este trabajo fueron los publicados por Ahmed et al. (2006) y Thaipadungpanit et al. (2007) y comprenden 6 y 7 loci respectivamente, presentados en la Tabla 4. En adelante se identificaran como esquema 6LH (6 loci, procedente de Holanda) y esquema 7LT (7 loci, procedente de Tailandia) para mayor simplicidad.

Tabla 4. Loci incluidos en los esquemas tailandés 7LT (Thaipadungpanit et al., 2007) y holandés 6LH (Ahmed et al. en 2006).

Esquema	Locus	Proteína codificada
6LH	<i>adk</i>	Adenilato ciclasa
	<i>icdA</i>	Isocitrato dehidrogenasa
	<i>lipL32</i>	Lipoproteína lipL32 de membrana externa
	<i>lipL41</i>	Lipoproteína lipL41 de membrana externa
	<i>rrs2</i>	16S ARNr
	<i>secY</i>	Preproteína translocasa <i>secY</i>
7LT	<i>fadD</i>	Ligasa putativa de ácidos grasos <i>CoA</i> de cadena larga
	<i>glmU</i>	UDP-N-acetylglucosamina pirofosforilasa
	<i>mreA</i>	Proteína <i>rodA</i> (<i>Rod shape-determining protein rodA</i>)
	<i>pfkB</i>	Riboquinasa
	<i>pntA</i>	NAD(P) transhidrogenasa subunidad alfa
	<i>sucA</i>	Componente 2-oxoglutarato dehidrogenasa-decarboxilasa
	<i>tpiA</i>	Triosefosfato isomerasa

5.4.3.2. Reacciones de amplificación por PCR

a. Esquema 7LT

Las reacciones de amplificación para los genes del esquema 7LT se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L, utilizando los reactivos y las concentraciones descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos usados y sus concentraciones finales en la mezcla de reacción de la PCR.

Reactivo	Concentración final	Ciclado
Buffer 5X (Promega)	1X	94° C 5 min. 94° C 30 seg. 50° C 15 seg. 72° C 50 seg . (35 ciclos) 72° C 10 min.
Deoxinucleósido trifosfato (dNTPs, Promega)	100 mM (25 mM c/u)	
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Promega) 50 mM	2,5 mM	
Oligonucleótidos	4 uM c/U	
GoTaq DNA polymerase (Promega)	0,025 U/μL	
ADN templado	0,6 ng/μL	
Volumen final de la reacción = 50 μL		

Durante la puesta a punto de las amplificaciones, se realizaron diferentes modificaciones respecto del protocolo original descrito por Thaipadungpanit y col. (2007). Las secuencias de los *primers* que se utilizaron para las amplificaciones son las que se publicaron originalmente, con excepción del locus *fadD*. Durante la optimización de las reacciones, se obtuvieron rendimientos muy bajos de amplificación con los *primers* originales. Por esa razón, los *primers forward* y *reverse* de *fadD* se rediseñaron utilizando la aplicación Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) en busca de mejorar los resultados. Finalmente la amplificación del locus en todo el conjunto de cepas de la colección se realizó con los *primers* nuevos (*fadD*-Fnew y *fadD*-Rnew). Las secuencias correspondientes y el tamaño de los fragmentos obtenidos se listan en la Tabla 6.

Tabla 6. *Primers* usados para amplificar los 7 loci del esquema 7LT. Se muestran los tamaños de los productos de PCR en pares de bases.

Gen	Secuencia nucleotídica	Tamaño amplicón
<i>fadD</i>	F-new: 5'-ACGTGATCTCCCTTATGCCAAGCA-3', R-new: 5'-ATCCAACCGACAGAAGTATGGCGT-3'	455 pb
<i>glmU</i>	F: 5'-GGAAGGGCACCCGTATGAA-3' R: 5'-TCCCTGAGCGTTTTGATTT-3'	443 pb
<i>mreA</i>	F: 5'-GTAAAAGCGGCCAACCTAACAC-3' R: 5'-ACGATCCCAGACGCAAGTAA-3'	434 pb

<i>pfkB</i>	F: 5'-CCGAAGATAAGGGGCATACC-3' R: 5'-CAAGCTAAAACCGTGAGTGATT-3'	431 pb
<i>pntA</i>	F: 5'-TGCCGATCCTACAACATTA-3' R: 5'-AAGAAGCAAGATCCACAACACTAC-3'	524 pb
<i>sucA</i>	F: 5'-AGAAGAGGCCGTTATCATCAG-3' R: 5'-CTCCGGGTCGTCTCCATTTA-3'	446 pb
<i>tpiA</i>	F: 5'-AAGCCGTTTTCTAGCACATTC-3' R: 5'-AGGCGCCTACAAAAAGACCAGA-3'	425 pb

Para visualizar los productos obtenidos se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con el colorante GelRed y buffer TAE 1X. Se sembraron 5 µL del producto de PCR, y al finalizar la corrida se observaron en luz UV para determinar la presencia de amplificación.

b. Esquema 6LH

En la Tabla 7 se listan las secuencias de los *primers* empleados en la amplificación de los 6 loci de este esquema. Las reacciones de amplificación para los genes del esquema de 6 loci se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, utilizando los reactivos y el ciclado expresados en la Tabla 8.

Tabla 7. *Primers* utilizados en la amplificación del esquema 6LH.

Gen	Secuencia nucleotídica	Tamaño amplicón
<i>adk</i>	F: 5'-GGGCTGGAAAAGGTACACAA-3' R: 5'-ACGCAAGCTCCTTTGAATC-3'	531pb
<i>icdA</i>	F: 5'-GGGACGAGATGACCAGGAT-3' R: 5'-TTTTTTGAGATCCGCAGCTTT-3'	674pb
<i>LipL41</i>	F: 5'-TAGGAAATTGCGCAGCTACA-3' R: 5'-GCATCGAGAGGAATTAACATCA-3'	520pb
<i>rrs2</i>	F: 5'-CATGCAAGTCAAGCGGAGTA-3' R: 5'-AGTTGAGCCCGCAGTTTTTC-3'	541pb
<i>secY</i>	F: 5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3' R: 5'-CCGTCCCTTAATTTTACTTCTTC-3'	549pb

LipL32	F: 5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3'	474pb
	R: 5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3'	

Tabla 8. Reactivos y sus concentraciones finales en la mezcla de reacción de la PCR para el esquema 6LH.

Reactivo	Concentración final	Ciclado
Buffer 5X (Promega)	1X	94° C 5 min
Deoxinucleósido trifosfato (dNTPs, Promega)	100 mM (25 mM c/u)	
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Promega) 50 mM	2,5 mM	94° C 30 seg
Oligonucleótidos	4 uM c/U	
GoTaq DNA polymerase (Promega)	0,025 U/μL	58° C 30 seg
ADN templado	0,6 ng/μL	72° C 1 min
Volumen final de la reacción = 50 μL		(35 ciclos)
		72° C 7 min.

5.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR correspondientes a 16S ARNr y MLST fueron purificados como paso previo a su secuenciación. Se realizaron dos tipos de purificaciones, precipitación con EDTA o *kit* comercial, dependiendo de la intensidad de la banda observada en el gel de agarosa. En la mayoría de los casos las bandas resultaron intensas, y ante la abundancia de producto se utilizó la precipitación con EDTA. Para ello, se adicionó un volumen de 11,25 μL de EDTA (125 mM) y 135 μL de etanol 100 % por cada 45 μL de producto de PCR se centrifugó 20 minutos a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 120 μL de etanol 70 % y se dejó secar hasta la evaporación del etanol. Finalmente se resuspendió en 25 μL de agua estéril.

En los casos donde la banda observada en el gel fue tenue, se utilizó la purificación mediante un *kit* comercial (PCR Purification Kit, Qiagen) para asegurar un mejor rendimiento..

Los productos purificados se cuantificaron mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific, E.E.U.U.) verificándose que su concentración fuese adecuada para su posterior secuenciación. Se estableció una concentración mínima de producto purificado a

secuenciar de 7ng/μL, en función de lo requerido por el prestador del servicio de secuenciación.

5.6 Secuenciación de productos de PCR

La secuenciación de los productos de amplificación de 16S ARNr y MLST se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA, el cual cuenta con un secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, E.E.U.U.), que opera mediante electroforesis capilar. Se enviaron los productos de PCR purificados al servicio junto con los mismos oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación, requeridos por la reacción de secuenciación. Los archivos de las secuencias se recibieron en formato .ab1, que permite visualizar los electroferogramas a través de programas específicos que serán detallados más adelante.

5.7 Procesamiento general de secuencias

A partir de la recepción de las secuencias en formato .ab1, éstas fueron sometidas a diferentes etapas de procesamiento hasta la obtención de un archivo .fasta conteniendo la secuencia editada final. El paso inmediato posterior a la recepción de una secuencia fue la inspección del archivo .ab1 que contiene el electroferograma para verificar la calidad de la secuencia y la presencia de bases indeterminadas. Se utilizó el módulo Trev del paquete Staden Package (MRC-LMB, Reino Unido). Si la calidad del electroferograma era aceptable (en base al indicador de Prhred, asignado por el secuenciador a cada base), se continuaba el procesamiento. En los casos donde se identificó la presencia de bases indeterminadas a lo largo de la secuencia (indicadas con letras N), se repitió la secuenciación o bien la amplificación del fragmento.

5.7.1. Generación de secuencia consenso

El conjunto de programas de análisis de secuencias Staden Package (MRC-LMB, Reino Unido) cuenta con varios módulos que proveen distintos tipos de análisis. El primer módulo aplicado fue Pregap4, que permite realizar un preprocesamiento de los archivos .ab1, recortando los extremos de baja calidad y calculando la precisión de las bases asignadas entre otros parámetros. Si los archivos correspondientes a las hebras complementarias de un mismo fragmento superan este análisis inicial implica que su calidad es aceptable y pueden ser ingresados en el siguiente módulo. Éste se denomina Gap4 y permite ensamblar las hebras

complementarias, de modo de generar una única secuencia consenso a partir de ambas. De este modo, el procesamiento de las secuencias mediante Pregap y Gap4 genera una secuencia consenso para cada loci perteneciente a una cepa, analizado generando un archivo de salida .fasta con dicha secuencia.

5.7.2. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias nucleotídicas constituye el proceso de armado de la matriz de datos que será el archivo de entrada para los posteriores análisis de relaciones filogenéticas entre las distintas cepas estudiadas. De esta manera, se evidencian homologías o polimorfismos (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms). Estos últimos darán lugar a la matriz de caracteres (SNPs) para diferentes taxones (cepas). El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el algoritmo Clustal W, sin modificar los parámetros por defecto, a través del programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Una vez obtenido el alineamiento se cortaron los extremos de las secuencias obteniéndose un archivo multifasta para cada locus en estudio, incorporando exactamente la misma región génica de cada locus en todas las cepas estudiadas.

5.8 Determinación de especie: análisis del locus 16S ARNr

La clasificación por especie de *Leptospira* no fue siempre obtenida de las colecciones de aislamientos o cepas. De este modo se estableció como primer paso en el algoritmo de tipificación molecular el análisis del locus 16S ARNr de *Leptospira*. Como fuera mencionado en el punto 4.1 de la presente sección este análisis consta de la amplificación de una región específica del gen, , su posterior secuenciación y la comparación con secuencias depositadas en la base de datos más utilizada para depositar y comparar secuencias de 16S provenientes de bacterias y arqueas es Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>). Los resultados del alineamiento de la secuencia incógnita con las secuencias depositadas mediante el algoritmo BLAST se expresan como un puntaje o *score*, y un porcentaje de identidad (bases iguales), los que aumentan cuanto mayor es la similitud entre secuencias. Se decide la especie a la que corresponde la secuencia entre aquellas que presentan el *score* más alto y una identidad mayor al 90%, que en general son varias secuencias de una misma especie.

5.9 Tipificación por MLVA

La metodología de tipificación por MLVA (*Multi-Locus Variable number of tandem repeats Analysis*) consiste en la amplificación de diferentes loci que constituyen unidades repetitivas. Éstas pueden ser de tipo microsatélites o minisatélites, en un rango de 8 a 100 pares de bases. La determinación del número de repeticiones de cada locus en un dado aislamiento permite diferenciar alelos pudiéndose además determinarse un perfil alélico en base a los loci incluidos en la tipificación. A través de estos perfiles es posible diferenciar variantes genéticas del patógeno en estudio. En este trabajo se tipificaron cepas pertenecientes a la especie *L. interrogans* mediante los 8 loci VNTR del esquema de MLVA propuesto por Majed et al. (2005).

5.9.1. Electroforesis analítica

Habiéndose confirmado la obtención de producto de PCR para los 8 loci, se llevó a cabo una electroforesis analítica utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Promega, E.E.U.U.) para determinar los pesos moleculares de los fragmentos. La electroforesis horizontal se llevó a cabo a través de una corrida en geles de agarosa al 2 % durante una hora a 80 V. Luego de la corrida la imagen del gel fue digitalizada utilizando el sistema de procesamiento de imágenes Geldoc (Bio-Rad, E.E.U.U.) para su posterior análisis.

5.9.2. Análisis de datos

El número de copias de cada VNTR puede deducirse a partir de los tamaños de banda de los productos amplificados, para lo cual se utilizó la imagen del gel analítico. Esta fue procesada mediante el software GelCompar (AppliedMaths, Bélgica), el cual permite estimar en forma precisa el tamaño en pares de bases correspondiente a cada banda. Conociendo el tamaño de la repetición (*repeat*) se puede calcular el número de copias de la misma y por lo tanto codificar el alelo que le corresponde a esa cepa, mediante la fórmula:

$$\text{Número de repeticiones} = (\text{tamaño del fragmento amplificado (pb)} - \text{regiones flanqueantes (pb)}) / \text{tamaño del repeat (pb)}$$

Cuando el número de repeticiones resultó menor a 1, éste se aproximó a cero. De esta manera se asignó un alelo a cada VNTR correspondiente al número de repeticiones y se obtuvo para cada cepa un perfil alélico compuesto por 8 números.

5.10 Tipificación por *multilocus sequence typing* (MLST)

El método de tipificación molecular denominado *multilocus sequence typing* o MLST se utiliza para la genotipificación de patógenos, principalmente bacterianos, y consiste en el análisis de 6 a 10 regiones génicas correspondientes a genes que intervienen en rutas metabólicas del microorganismo. Para ello, las regiones son amplificadas, secuenciadas, codificadas y depositadas en bases de datos internacionales debido a que los datos generados son fácilmente compartidos por diferentes laboratorios de manera remota. La codificación se lleva a cabo asignándole un número arbitrario y por orden de llegada a cada variante de cada locus. Para cada cepa entonces, se contará con un conjunto de 6 a 10 números a cuya combinación se le asignará un número o perfil alélico (*Sequence Type* o ST). Éste método permite tanto la tipificación de cepas como la realización de estudios orientados a análisis epidemiológicos (Maiden et al. 1998).

Como fuera mencionado en el punto 4.3.1 de esta sección, en este trabajo se realizó la tipificación de cepas mediante la aplicación dos esquemas de MLST, de 6 y 7 loci cada uno, a los que denominamos 6LH y 7LT respectivamente (Ahmed et al. 2006, Thaipadungpanit et al. 2007). El esquema 7LT se encontró disponible en una base de datos pública de MLST (leptospira.mlst.net, con sede en el Imperial College, Reino Unido) mientras que los datos correspondientes al 6LH fueron cedidos por los autores del trabajo ya que no se encontraban disponibles en ninguna base de datos ni tampoco habían sido depositadas en el motor de búsqueda GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para las secuencias pertenecientes a MLST se generaron diferentes archivos .fasta correspondientes a cada uno de los *locus* del esquema. Luego se generó una secuencia consenso para cada *locus* y se alineó con secuencias ya recortadas y procesadas que se obtuvieron de la base de datos <http://www.leptospira.mlst.net>. Éstas se utilizaron como modelo de manera de poder editar las secuencias nuevas, recortando los extremos y obteniendo una secuencia final de un tamaño específico, que consiste en el fragmento utilizado para determinar el alelo.

5.10.1. Determinación de *SequenceType* (ST)

En este punto se plantearon dos situaciones: ajustar las secuencias obtenidas del esquema 7LT a los STs ya depositados en la base de datos <http://www.leptospira.mlst.net>. codificando

únicamente los nuevos alelos o realizar íntegramente la codificación de los alelos del esquema 6LH ya que no se encontraba codificado hasta el momento.

Para la determinación de STs correspondientes al esquema 7LT se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se obtuvieron los consensos correspondientes a los 7 loci del esquema 7LT siguiendo los pasos detallados en el punto 7;
2. Ingreso a la base de datos: <http://leptospira.mlst.net/>:

MLST
Multi Locus Sequence Typing

m1st.net | leptospira.mlst.net

Tuesday 6th January 2015

DATA ANALYSIS

DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.henselae*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*
- C.krusei*
- C.tropicalis*
- C.jejuni*
- C.neoformans var grubii*
- E.coli*
- E.faecalis*
- E.faecium*
- H.influenzae*
- H.pylori*
- Leptospira spp.***
- M.catarrhalis*
- N.meningitidis*
- S.agalactiae*
- S.aureus*
- S.dysgalactiae*
- S.enterica*
- S.epidermidis*
- S.pneumoniae*
- S.pyogenes*
- S.suis*
- V.vulnificus*

SUBMISSIONS

NEWS

LINKS

NOTE: This site contains the NEW consensus MLST scheme. For previous data [click here](#)

Leptospira spp.

- Organism Specific Information
- Concatenate Sequences
- Download Alleles
- Download STs
- Download as Excel
- Compare profile to refset
- Draw tree using own MLST data
- Contact Curator
- Leptospira* Links
- eBURST
- MLST-MAPS

Profile Query **Locus Query** **Batch Query**

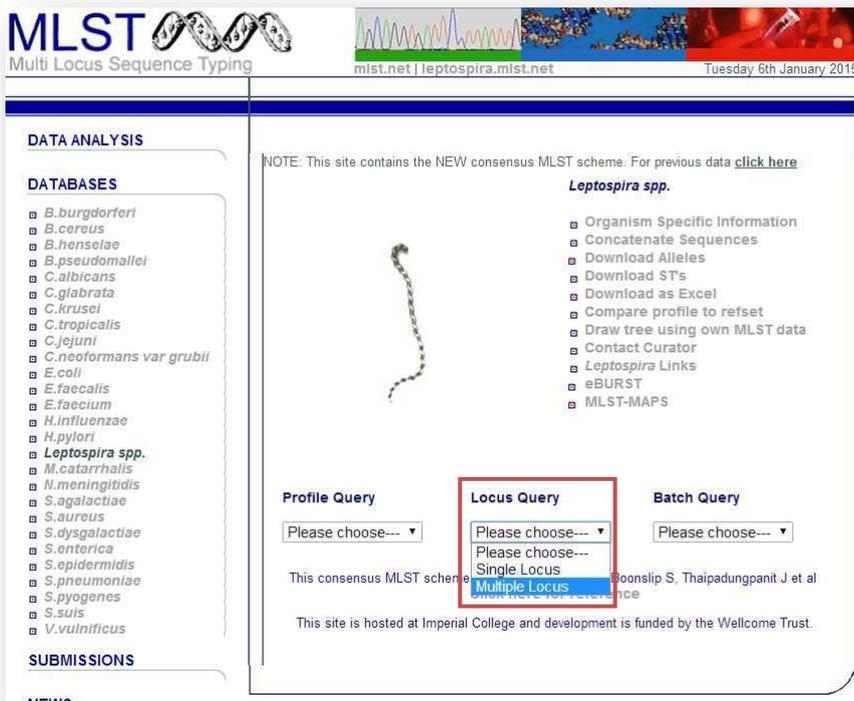
Please choose--- ▾ Please choose--- ▾ Please choose--- ▾

This consensus MLST scheme has been developed by Boonslip S, Thaipadungpanit J et al
[Click here for reference](#)

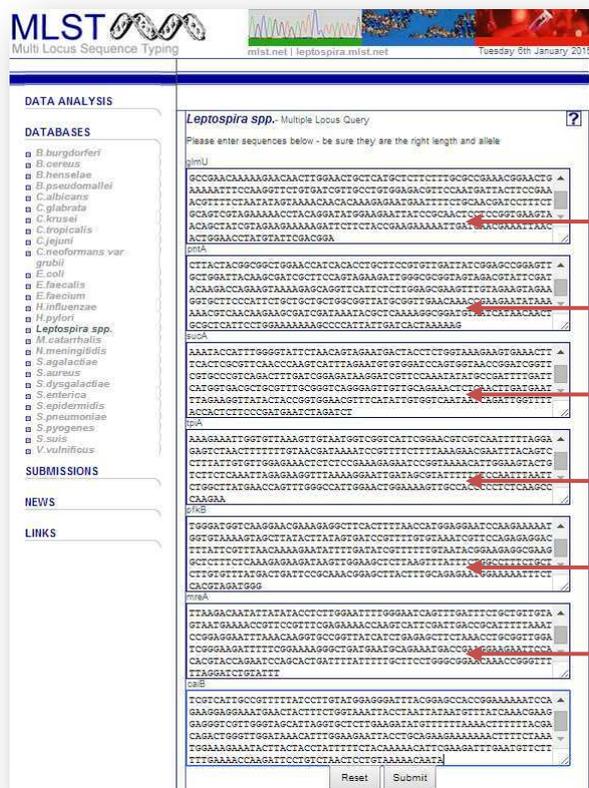
This site is hosted at Imperial College and development is funded by the Wellcome Trust.

Figura 1. Página principal del sitio *Leptospira.mlst.net*, donde se aloja la base de datos de secuencias de 7LT.

3. Se seleccionó la opción “Multiple locus” del menú desplegable “Locus Query”:



4. Se ingresaron las secuencias con formato FASTA de los diferentes loci:



Copiar y Pegar las secuencias desde los archivos .fasta

A partir de allí se obtuvo el código numérico correspondiente al alelo para cada locus.

MLST Multi Locus Sequence Typing
mlst.net | leptospira.mlst.net Tuesday 6th January 2015

DATA ANALYSIS

DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.henselae*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*
- C.krusei*
- C.tropicalis*
- C.jejuni*
- C.neoformans var grubii*
- E.coli*
- E.faecalis*
- E.faecium*
- H.influenzae*
- H.pylori*
- Leptospira spp.***
- M.catarrhalis*
- N.meningitidis*
- S.agalactiae*
- S.aureus*
- S.dysgalactiae*
- S.enterica*
- S.epidermidis*
- S.pneumoniae*

Leptospira spp. - Multiple Locus Query Results

Locus	Allele Number	Error Messages	Action
glmU	3	OK	None
pntA	3	OK	None
sucA	3	OK	None
tpiA	1	OK	None
pfkB	4	OK	None
mreA	5	OK	None
caiB	16	OK	None

Submit data for allelic profile query

Exact or nearest match

Submit

Y en caso de existir coincidencia en la totalidad de los loci se obtuvo el ST:

MLST Multi Locus Sequence Typing
mlst.net | leptospira.mlst.net Tuesday 6th January 2015

DATA ANALYSIS

DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.henselae*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*
- C.krusei*
- C.tropicalis*
- C.jejuni*
- C.neoformans var grubii*
- E.coli*
- E.faecalis*
- E.faecium*
- H.influenzae*
- H.pylori*
- Leptospira spp.***
- M.catarrhalis*
- N.meningitidis*
- S.agalactiae*
- S.aureus*
- S.dysgalactiae*
- S.enterica*
- S.epidermidis*
- S.pneumoniae*
- S.pyogenes*

Leptospira spp. - Allelic Profiles query results

Your sequence type is not found, the closest matches are shown below

Strain	ST	Species	glmU	pntA	sucA	tpiA	pfkB	mreA	caiB
Pomona	140	<i>L. interrogans</i>	3	3	3	1	4	5	16
R235	140	<i>L. interrogans</i>	3	3	3	3	4	5	16
An 7705	140	<i>L. interrogans</i>	3	3	3	3	4	5	16

Submit profile for a further query -

glmU	pntA	sucA	tpiA	pfkB	mreA	caiB	Exact or nearest match
3	3	3	1	4	5	16	Submit

Profile Query Locus Query Batch Query

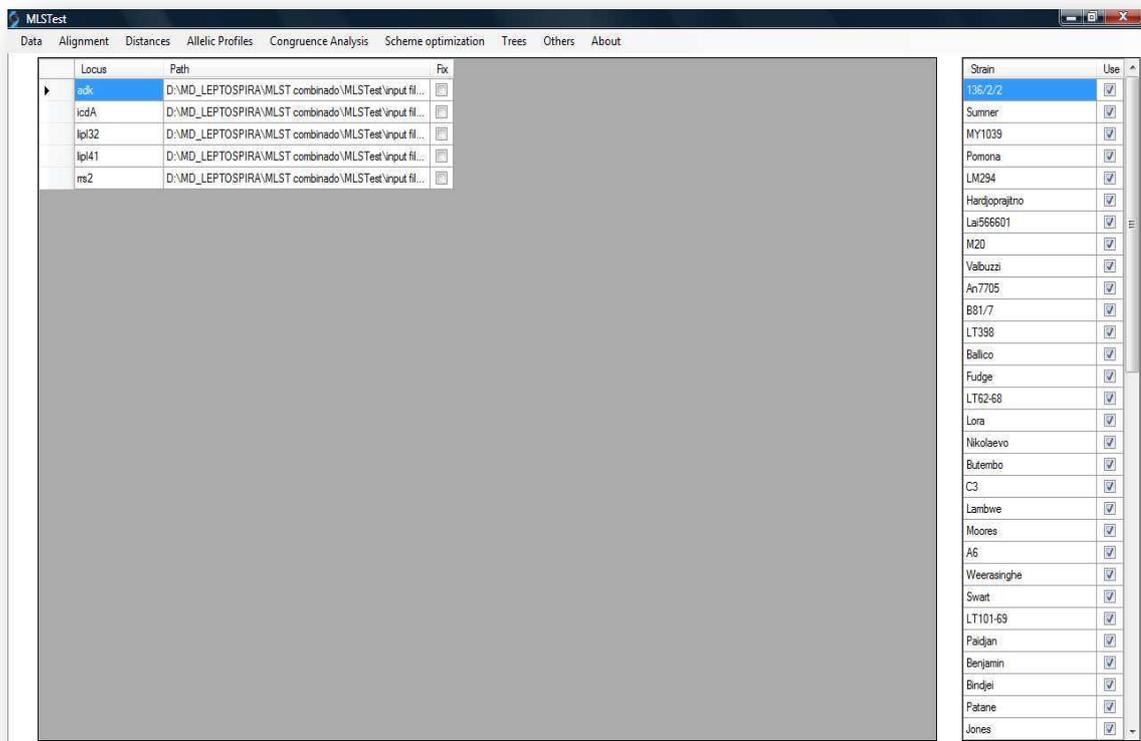
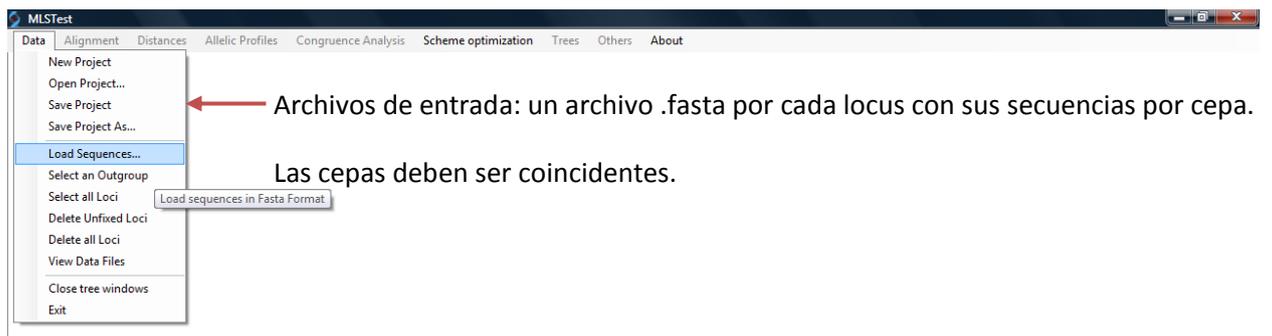
Please choose--- Please choose--- Please choose---

En el caso de no haber coincidencia de una a siete secuencias ingresadas con ninguna de las depositadas en la base de datos, éstas fueron enviadas al curador de la base de datos, el cual realizó la asignación manual de un nuevo alelo, correlativo a los ya existentes.

Para la determinación de STs correspondientes al esquema 6LT se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Como se mencionó anteriormente los alelos correspondientes a este esquema no habían sido previamente codificados por lo que se realizó la codificación con el programa MLSTest versión 1.0.1.23 (Tomasini et. al. 2014). Para ello:

1. Se ingresaron los archivos .fasta al programa:



2. Se codificaron los alelos a partir del comando "Make/View Allelic Profiles" del menú "Allelic Profiles":



Y se obtuvieron los códigos para cada alelo y su combinación en STs:

Name	adk	icdA	lip32	lip41	ms2	ST
136/2/2	1	1	1	1	1	1
Summer	2	2	2	2	2	2
MY1039	3	3	3	3	2	3
Pomona	4	2	4	4	2	4
LM294	4	2	2	2	3	5
Hardjopraino	4	2	2	2	3	5
Lai56601	3	2	2	5	3	6
M20	5	2	2	5	3	7
Valbuzzi	5	4	2	5	3	8
An7705	6	5	5	6	4	9
B81/7	7	6	6	7	1	10
LT398	5	3	2	8	3	11
Ballico	8	2	2	9	3	12
Fudge	5	2	2	10	3	13
LT62-68	9	7	7	11	2	14
Lora	10	2	3	12	3	15
Nikolaev	11	8	6	13	5	16
Butembo	12	9	8	7	6	17
C3	13	10	9	14	3	18
Lambwe	14	11	8	15	1	19
Moorea	5	12	2	16	2	20
A6	3	13	2	17	3	21
Weerasinghe	3	14	2	18	2	22
Swart	3	15	2	19	3	23
LT101-69	3	3	2	20	7	24
Paidjan	3	2	2	20	3	25
Benjamin	15	2	2	20	3	26
Bindjei	5	2	2	20	2	27
Palane	5	2	2	21	3	28
Jones	16	3	2	20	3	29
3522C	17	16	8	22	1	30

Number of Loci:5 Number of Sequences:65 Outgroup:none

5.11 Análisis conjunto de MLVA y MLST (7LT)

A partir de los genotipos obtenidos por MLVA y MLST 7LT, se diseñó un análisis unificado para ambas estrategias de tipificación. Este análisis consistió en generar un genotipo combinado a partir de los 8 alelos de VNTRs y los 7 loci de MLST, obteniendo un perfil alélico de 15 números al que se denominó STVNTR. La finalidad de este análisis fue la de evaluar la complementariedad de los métodos, considerando que cada uno proporciona una mejor resolución en distintos *clusters* de cepas.

5.11.1. Análisis filogenético

En este caso se llevó a cabo un análisis de relaciones filogenéticas no basadas en métodos de distancia sino cladísticos ya que los marcadores unificados en la matriz de datos presentan diferentes tiempos evolutivos. Para ello se confeccionó una matriz de 25 taxones (cepas) y 15 caracteres correspondientes a los alelos numéricos provenientes de los dos métodos de tipificación. Esta matriz se utilizó como archivo de entrada para realizar un análisis de máxima parsimonia (MP) mediante el software TNT 1.1 (Tree Analysis Using New Technology, Goloboff et al. 2008). Se realizó una búsqueda heurística tradicional, utilizando al algoritmo de intercambio de ramas TRB (Tree Bisection-Reconnection) con 100 réplicas. El soporte rama fue evaluado mediante 500 réplicas *bootstrap*.

5.11.2. Cálculo del índice de poder discriminatorio

El índice de diversidad de Simpson (D) se basa en el índice de poder discriminatorio propuesto por Hunter y Gaston (1988) y se adaptó para su aplicación en epidemiología molecular. Permite comparar métodos de tipificación y evaluar cuál de ellos es más eficiente en función de su probabilidad de distinguir dos cepas diferentes en una población dada según los caracteres en estudio. Por lo tanto se aplicó el índice de Simpson para cada método de tipificación por separado, MLVA y MLST 7LT, y para el resultante de la combinación de los mismos, STVNTR. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

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

donde N es el número total de cepas en la población muestreada, s es el número total de genotipos descritos, y n_j es el número de cepas que pertenecen al j-ésimo genotipo. El resultado de la ecuación se interpreta como la probabilidad de que dos cepas muestreadas consecutivamente pertenezcan al mismo genotipo. El cálculo de esta probabilidad se utilizó como un parámetro de comparación de los métodos para así reconocer cuál de ellos representa mejor la variabilidad en la colección evaluada.

5.12 Reevaluación de esquemas MLST

Los 2 esquemas de MLST descritos con anterioridad y llamados aquí 6LH y 7LT constituyen los de mayor aplicación en la tipificación de cepas de *Leptospira*. Los 13 loci que componen ambos esquemas fueron reevaluados con 48 cepas de referencia y 17 aislamientos argentinos, con el objetivo de determinar los de mayor poder discriminatorio y optimizar la tipificación en un esquema de MLST unificado.

5.12.1. Colección de cepas tipificadas

Para la selección de la nueva combinación de loci la colección analizada estuvo integrada por 48 cepas de referencia y 17 aislamientos argentinos. Las 48 cepas de referencia fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad de las secuencias correspondientes a los esquemas 6LH y 7LT. De esta manera el gen codificante para la preproteína translocasa SecY (*secY*) fue excluido del análisis ya que estaba disponible en una cantidad reducida de cepas. Como resultado fueron evaluados 12 de los 13 genes. Las cepas seleccionadas representaron 2

especies patógenas del género *Leptospira* (*L. interrogans* y *L. kirschneri*) y provenían de una amplia variedad de hospedadores, tanto de origen animal como humano, diferentes orígenes geográficos y años de aislamiento.

Las cepas argentinas utilizadas se especifican en la Tabla 1 del Anexo. En cada caso se confirmó la especie a través de la amplificación y secuenciación del fragmento de 16S ARNr.

5.12.2. Evaluación de 12 loci

Inicialmente incorporamos al análisis los 13 loci correspondientes de los 2 esquemas (6LH y 7LT) a saber: *fadD*, *glmU*, *mreA*, *pfkB*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs2* y *secY* (ver punto 4.3.1). Sin embargo, dado que la secuencia correspondiente al locus *secY* no estaba disponible para numerosas cepas de referencia se decidió excluirlo ya que en caso contrario se reduciría dramáticamente el número de cepas analizadas.

Se realizó una evaluación preliminar a partir de los 12 loci utilizando un subconjunto de 65 cepas que pertenecían sólo a las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri*, incluyendo 17 aislamientos argentinos previamente caracterizados. Se editaron las secuencias de todas las cepas locus por locus utilizando el software MEGA 6, generando un archivo .fasta por cada uno (ver punto 7). Dado que se estaba evaluando un set combinado de loci no se pudo utilizar una base de datos para determinar los alelos y el ST. Debido a ello se empleó el software MLSTest 1.0.1.23 como fuera descrito en el punto 10.1

5.12.2.1. Análisis de asociación de STs

Del mismo modo que para el esquema de MLST 7LT (Tailandia), en este análisis se determinaron nuevamente los complejos clonales formados para la tipificación con 12 loci, utilizando el software PHYLOViZ 1.0 (<http://www.phyloviz.net/>). En este caso se configuró el análisis con parámetros menos restrictivos, permitiendo que los STs vinculados pudieran variar hasta en 3 loci (TLVs, *three locus variants*). Debido al número de loci involucrados es muy probable que los STs varíen en más de un locus, y si no se permitiera esta flexibilidad, se observarían muy pocas conexiones y se dificultaría el hallazgo de complejos clonales (CCs).

5.12.2.2. Cálculo de parámetros de diversidad

Junto con la determinación de los perfiles alélicos el software MLSTest realiza el cálculo de diferentes índices que permiten evaluar la diversidad de cada locus. Estos fueron el número de alelos, número de polimorfismos, la eficiencia de tipificación y el poder discriminatorio (índice

de Simpson). Las sustituciones nucleotídicas sinónimas versus no sinónimas (debe calcularse al evaluar genes candidatos para MLST) obtuvieron utilizando el software DNAsp. Asimismo se contabilizó manualmente el número de veces que un locus generaba una variante entre STs participantes de un complejo clonal. Éste valor permite reconocer aquellos loci que son capaces de conectar los diferentes genotipos o STs, lo cual tiene importancia al realizar un seguimiento epidemiológico pues se buscan conexiones entre genotipos diferentes. El significado de los parámetros se detalla en la Tabla 9. Los diferentes parámetros fueron tenidos en cuenta para la selección de los loci a incluir en el esquema optimizado.

Tabla 9. Definición de los parámetros indicadores de diversidad que se analizaron para cada locus.

Parámetros	Significado
N° alelos	Número de variantes alélicas (secuencias diferentes) para cada loci halladas en la colección de cepas.
N° polimorfismos	Número de SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>) por locus.
Eficiencia de tipificación	Cociente entre el número de alelos y el número de polimorfismos.
Poder discriminatorio (Índice de Simpson)	Estima la probabilidad de extraer dos alelos distintos de una población. Varía entre 0 y 1 (a mayor diversidad el valor tiende a 1)
dN / dS	Cociente entre el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas en las secuencias. Permite estimar si la secuencia está bajo selección negativa ($dN/dS < 1$).
goeBURST (N° Complejos Clonales)	Indicador de la participación del locus en la diversificación de STs cercanamente relacionados dentro de un complejo clonal.

5.12.2.3. Filogenia

Se construyó un árbol filogenético para verificar las relaciones que establecidas entre las cepas al incluir los 12 loci iniciales. Para esto se concatenaron las 12 secuencias correspondientes a cada una de las 65 cepas analizadas, y se construyó el árbol mediante el método de máxima verosimilitud en el software MEGA 6. Previamente se determinó el modelo de sustitución nucleotídica a aplicar utilizando el programa JModelTest 2.1.1, seleccionando el modelo de Tamura-Nei 93 (con distribución gamma y proporción de sitios invariantes).

5.12.3. Optimización del esquema

A partir del análisis del subconjunto de cepas mediante los 12 loci, se realizó una optimización del esquema con el fin de determinar si era posible obtener el mismo nivel de discriminación de las cepas de la colección mediante una combinación menor de loci, y hallar la combinación más discriminativa (número óptimo de loci). Para este análisis también se utilizó el software MLSTest.

5.12.3.1. Número óptimo de loci

El programa MLSTest aplica un algoritmo que estima la diversidad genética (DG) para cada combinación posible de loci, entre 2 y $n-1$ (siendo n el número total de loci evaluados). El número óptimo de loci se obtiene para aquella combinación donde un aumento en DG se vuelve poco probable al adicionar más loci. La diversidad genética se estima principalmente en términos de número de STs generados a partir de una dada combinación, es decir de n loci de un total de 12 loci. De esta manera el algoritmo inicialmente calcula el número de STs producidos a partir del total de loci ingresados, 12 en este caso. Luego se extraen loci del esquema y se prueban todas las combinaciones entre los restantes calculando el número de STs obtenidos (el cual puede diferir con cada combinación). De esta manera se busca generar el máximo número de STs con el mínimo número de loci. El software presenta como resultado una curva con un *plateau*, que coincide con el número óptimo de loci. Es posible alcanzar el número óptimo con más de una combinación de loci.

5.12.4 Tipificación mediante esquema de 7 loci Argentino (7LA)

A partir de la obtención de un número mínimo de loci, se tuvo en cuenta la evaluación individual de los mismos en base a los parámetros de diversidad para definir el esquema final. Dicho esquema final de 7 loci (7LA), que será descrito en Resultados, fue reevaluado en la colección completa de 116 cepas (25 cepas argentinas y 91 cepas de otras regiones geográficas) que incluyó las 7 especies patógenas principales de *Leptospira*: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii* y *L. alexanderi* (Tabla 1 del Anexo).

Se calculó el número de perfiles alélicos obtenidos con el nuevo esquema y se lo comparó con el obtenido previamente para los 12 loci. Se realizó nuevamente la reconstrucción filogenética (punto 12.2.3) y se analizaron las relaciones establecidas mediante esta nueva combinación. Asimismo, se recalcularon los parámetros de diversidad (punto 12.2.2) y se implementó el

análisis de asociación de STs (punto 12.2.1) mediante la metodología ya descrita para completar la evaluación del esquema.

5.13 MLST 7LA *in silico* a partir de genomas

5.13.1 Selección y descarga de secuencias genómicas

Se realizó una selección de secuencias genómicas de *Leptospira* disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=LEPTOSPIRA>), para realizar la tipificación *in silico* de los mismos utilizando el esquema 7LA (Resultados, punto 6.7). Se seleccionaron los genomas de especies patógenas o intermedias, donde la mayoría habían sido secuenciados recientemente a través de un proyecto asociado al instituto J. Craig Venter (JCVI, E.E.U.U.) (<http://gsc.jcvi.org/projects/gsc/leptospira/index.php>). Los mismos se encontraban en formato "draft" (parcialmente ensamblados), con un número variable de *contigs* (fragmentos de la secuencia total). Además, se incluyeron 7 genomas completamente ensamblados. Todos ellos se encontraban disponibles en formato SRA (Sequence Read Archive), conteniendo las secuencias crudas o *short sequence reads*, o bien en formato .fsa (*contigs*, archivos de tipo fasta conteniendo las secuencias genómicas). Se seleccionó el formato .fsa para su descarga y posterior tipificación mediante el nuevo esquema de MLST (7LA). De este modo, se analizaron 283 cepas (Tabla 3, Anexo) incluyendo 9 especies patógenas.

5.14 Esquema de MLST reducido

Debido a que la obtención de aislamientos de *Leptospira* es sumamente difícil y constituye un factor limitante para la tipificación de esta bacteria, se desarrolló una adaptación del método MLST para su aplicación directamente sobre muestras clínicas (suero o sangre), con la perspectiva de determinar variante genéticas intraespecíficas, y por ende profundizar el seguimiento epidemiológico.

A partir de los análisis confeccionados en la reevaluación de esquemas previos de MLST (punto 12.3), se realizó una nueva selección de loci con el objetivo de hallar una combinación que minimizara el número de loci pero conservara el poder discriminatorio sobre un umbral aceptable. Asimismo, los loci a incluir en el esquema reducido debían ser preferentemente los de mayor sensibilidad en la amplificación por PCR. La finalidad fue que el esquema reducido

permitiera la tipificación de muestras altamente heterogéneas en su cantidad y calidad de ADN, como es frecuente en muestras clínicas. De lograrse un equilibrio entre obtención de amplificación y discriminación que provee el MLST, sería posible obtener información a partir de muestras que actualmente no son evaluadas a nivel molecular.

5.14.1. Selección inicial de loci

La metodología aplicada en la selección de loci fue análoga a la descrita previamente para la reevaluación de esquemas de MLST (punto 12.3). En este caso se partió del esquema de 7 loci ya optimizado, 7LA, y se utilizó el software MLSTest para correr nuevamente el algoritmo de número óptimo con el mismo set de 116 cepas y aislamientos. El análisis arrojó diferentes combinaciones de entre 1 y 7 loci, con el correspondiente poder discriminatorio, representado por el número de STs generados en la colección. Entre estas se preseleccionó una combinación de 3 loci: *adk*, *lipL41* y *mreA*, para realizar las siguientes etapas de evaluación y validación.

5.14.2. Evaluación de esquema reducido

Para analizar la capacidad de diferenciación de cepas del esquema reducido, se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud concatenando las secuencias de los 3 loci. El árbol filogenético resultante se comparó con el generado previamente con el esquema completo de 7 secuencias (7LA). Asimismo, se revisaron los árboles obtenidos para cada loci por separado, para discutir los aportes individuales de cada loci al esquema.

5.14.3. Aplicación en muestras clínicas

5.14.3.1. Muestras clínicas

Se trabajó a partir de 61 muestras clínicas de humanos, procedentes del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias (INER-CONI). Las muestras consistieron en suero, sangre o ADN total extraído de las mismas. En el último caso, la extracción del ADN se realizó en el laboratorio de origen mediante un kit de extracción de ADN de fluidos (QuiAQuick DNA Mini Kit, QIAGEN). La concentración de ADN total en la muestra fue cuantificada mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific) y conservado a -20 °C hasta su posterior utilización.

5.14.3.2. Determinación de especie

Las muestras se sometieron a una primer reacción de PCR para la caracterización de la especie mediante la amplificación del fragmento de 16S ARNr de *Leptospira* (primers LA y LB, ver punto

4.1). Se realizaron pequeñas modificaciones que se aplicaron para optimizar la amplificación en muestras clínicas. En este caso se utilizó un ciclado de tipo *touchdown* para facilitar la hibridación de los *primers*, dado que el volumen reducido de muestra no permitió una optimización inicial de la reacción.

Tabla 9. Reactivos y sus concentraciones finales en la mezcla de reacción de PCR 16S ARNr.

Reactivos	Concentración final	Ciclado <i>touchdown</i>
Buffer 5X (Promega)	1X	94° C 3 min, 54 °C 90 seg 72° C 2 min
Deoxinucleósido trifosfato (dNTPs, Promega) 100 mM (25 mM c/u)	2 mM cada uno	
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Promega) 25mM	2 mM	
Seroalbúmina bovina (BSA)	0,026 ug/μL	94° C 1 min 54°C 90 seg 72 °C 2 min (29 ciclos) 72° C 10 min
<i>Primers</i> 12,5 uM	0,25 uM	
GoTaq DNA polymerase (Promega)	0,025 U/μL	
ADN templado	5 μL (concentración variable)	
Volumen final de la reacción = 50 μL		

5.14.3.3. Tipificación por MLST reducido

Aquellas muestras que resultaron positivas a la amplificación de 16S fueron sometidas a subsiguientes reacciones de PCR para amplificar los loci de MLST reducido (3LA). Para ello se prepararon 3 mezclas de reacción con los *primers* correspondientes a cada marcador, y se unificaron las condiciones del ciclado para poder realizar las amplificaciones en simultáneo. Se programó un ciclado *touchdown* para facilitar la hibridación de los primers (dado que fue unificada la temperatura de *annealing*). Si bien las concentraciones de ADN global en las muestras fueron diferentes, se unificó el templado en 5 μL (10 % del volumen de reacción) para, *a priori*, estandarizar el proceso. En la Tabla 10 se presentan los reactivos y ciclado utilizados en la reacción.

Tabla 10. Condiciones de reacción de PCR para el esquema 3LA.

Reactivos	Concentración final	Ciclado <i>touchdown</i>
Buffer 5X (Promega)	1X	95° C 5 min 94 °C 30 seg 59 – 52° C 30 seg 72° C 1 min (8 ciclos)
Deoxinucleósidostrifosfato (dNTPs, Promega) 100 mM (25 mM cada uno)	8 mM (2 mM cada uno)	
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Promega) 25mM	1,25 mM	
Seroalbúmina bovina (BSA)	0,026 ug/μL	
Primers 100 uM	1 uM	
GoTaq DNA polymerase (Promega)	0,025 U/μL	
ADN templado	5 μL (concentración variable)	
Volumen final de la reacción = 50 μL		

Las amplificaciones positivas se purificaron y enviaron para su secuenciación.

Resultados

6. Resultados

En el ámbito de la epidemiología molecular, resulta relevante contar con cepas previamente caracterizadas taxonómicamente a nivel de especie, para posteriormente caracterizar sus variantes genéticas ya sea a través de marcadores moleculares o del análisis que surge a partir de la disponibilidad de la secuencia genómica.

En este trabajo fueron estudiados tanto cepas de referencia como aislamientos argentinos. Ambos fueron obtenidos de colecciones pertenecientes a laboratorios de referencia de nuestro país. Dichos laboratorios se centran principalmente en brindar un servicio de diagnóstico basado en estrategias serológicas, determinando en cada caso el serogrupo de cada aislamiento obtenido. Sin embargo, como se comentó en la Introducción de esta tesis (Taxonomía del género *Leptospira*) el serogrupo no representa una unidad taxonómica, y tampoco es un determinante de la especie. De esta manera, resultó relevante establecer los diferentes niveles de clasificación de las cepas y aislamientos estudiados. Para ello, se estableció un algoritmo de análisis con el serogrupo como dato de partida seguido de diferentes estrategias de tipificación molecular de acuerdo a niveles crecientes de poder discriminatorio (Figura 1).

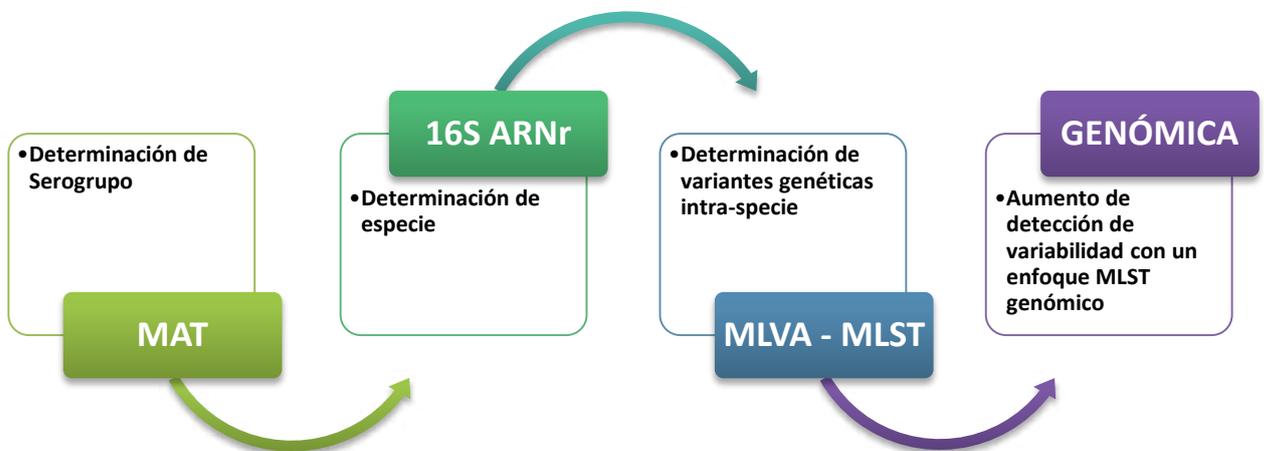


Figura 1. Algoritmo utilizado para la caracterización serológica y molecular de las cepas de referencia y aislamientos incluidos en el estudio.

Resultados - Capítulo 1

Aplicación y comparación de metodologías de tipificación molecular

Con el objetivo de realizar una primer instancia de tipificación de aislamientos de *Leptospira* spp. disponibles en los laboratorios de referencia (Materiales y Métodos), se procedió a aplicar los primeros pasos del algoritmo descrito en la Figura 1.

Para esta primera instancia, se trabajó con un total de 25 muestras, 18 aislamientos argentinos y 7 cepas de referencia. Previamente al análisis molecular, los aislamientos argentinos habían sido caracterizados por MAT (Test de Microaglutinación) en sus laboratorios de procedencia. En el caso de las cepas de referencia, también se contó con su caracterización a nivel de serovar de acuerdo a la bibliografía. De esta manera, entre los 18 primeros aislamientos analizados el serogrupo predominante fue Pomona (12/18, 67 %), seguido por Icterohaemorrhagiae (3/18, 17 %), Sejroe (2/18, 11 %), y Canicola (1/18, 5%) (Tabla 1).

En función del algoritmo establecido en la Figura 1, como primer paso de la caracterización molecular se realizó la determinación de la especie, confirmándose que el 100% de los mismos pertenecían a la especie *Leptospira interrogans* (Tabla1).

Tabla 1. Conjunto de cepas y aislamientos tipificados inicialmente por el esquema de MLST 7LT. Todos pertenecieron a la especie patógena *Leptospira interrogans*. *: Aislamientos estudiados *de novo*; ND: no determinado.

Cepa	Categoría	Serovar	Serogrupo	País	Hospedador
Comadreja*	Aislamiento	ND	Canicola	Argentina	comadreja
MY 1039	cepa de referencia	Portlandvere	Canicola	Jamaica	humano
Hond Utrecht IV	cepa de referencia	ND	Canicola	Holanda	canino
CañuelasIII*	Aislamiento	ND	Icterohaemorrhagiae	Argentina	porcino
E3*	Aislamiento	ND	Icterohaemorrhagiae	Argentina	humano
La Cava1*	aislamiento	ND	Icterohaemorrhagiae	Argentina	roedor
RGA	cepa de referencia	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Bélgica	humano
Ictero No.1	cepa de referencia	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Japón	humano
Fiocruz L1-130	cepa de referencia	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Brasil	humano
56601	cepa de referencia	Lai	Icterohaemorrhagiae	China	humano
AK-RFB*	Aislamiento	Pomona	Pomona	Argentina	bovino
CañuelasI*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	porcino
CañuelasII*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	porcino
Corrientes 266*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	bovino
Fulton*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	bovino
Marcos Juarez*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	bovino
Marcos Paz*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	porcino
Pujato*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	bovino

Rojas*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	bovino
V3P*	Aislamiento	ND	Sejroe	Argentina	roedor
Longchamps*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	humano
San Alfredo*	Aislamiento	ND	Pomona	Argentina	porcino
Pomona	cepa de referencia	Pomona	Pomona	Australia	humano
3705 SENASA*	Aislamiento	ND	Sejroe	Argentina	humano
3705 LiW-04-*W1	Aislamiento	ND	Sejroe	Argentina	humano

6.1 Tipificación por MLST

De manera de estudiar las variantes intraespecíficas, se aplicó la estrategia *Multilocus Sequence Typing* o MLST al conjunto de cepas previamente descripto pertenecientes a la especie de *Leptospira interrogans* (Tabla 1).

Entre los tres esquemas de MLST disponibles para la tipificación de *Leptospira* (Materiales y Métodos, punto 5.4.3.1), se optó por el esquema de siete loci que fue desarrollado por Thaipadungpanit y col. en Tailandia (7LT). A diferencia de los demás, éste contaba con una base de datos disponible en internet (<http://leptospira.mlst.net/>), con la cual comparar las secuencias obtenidas y determinar perfiles alélicos o STs (*sequence types*) (Thaipadungpanit et al., 2007).

6.1.1 Rediseño de *primers* esquema 7LT

El esquema 7LT consta del análisis de siete genes de los cuales seis se encuentran distribuidos en el cromosoma I y uno en el cromosoma II. Este último, el gen correspondiente a la enzima ligasa de ácidos grasos de cadenas largas (*Putative long-chain-fatty acid-CoA ligase*) o *fadD* presentó baja eficiencia de amplificación. De este modo, el mismo impedía completar el esquema 7LT, dificultando el análisis de las cepas.

De manera de aumentar la eficiencia de amplificación fueron diseñados y evaluados nuevos *primers* externos a los propuestos por los autores del trabajo original. Los mismos obtuvieron a partir de la secuencia genómica de la cepa de referencia 56601 de *Leptospira interrogans* serovar Lai. Los nuevos *primers* se denominaron *fadDFnew* y *fadDRnew*, y generaron un producto de amplificación de 700 pares de bases, que incluyó la región utilizada para MLST. Como se observa en la Figura 2, la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación del gen *fadD* se incrementó en un factor de 25 respecto del protocolo propuesto por el trabajo original del esquema 7LT.

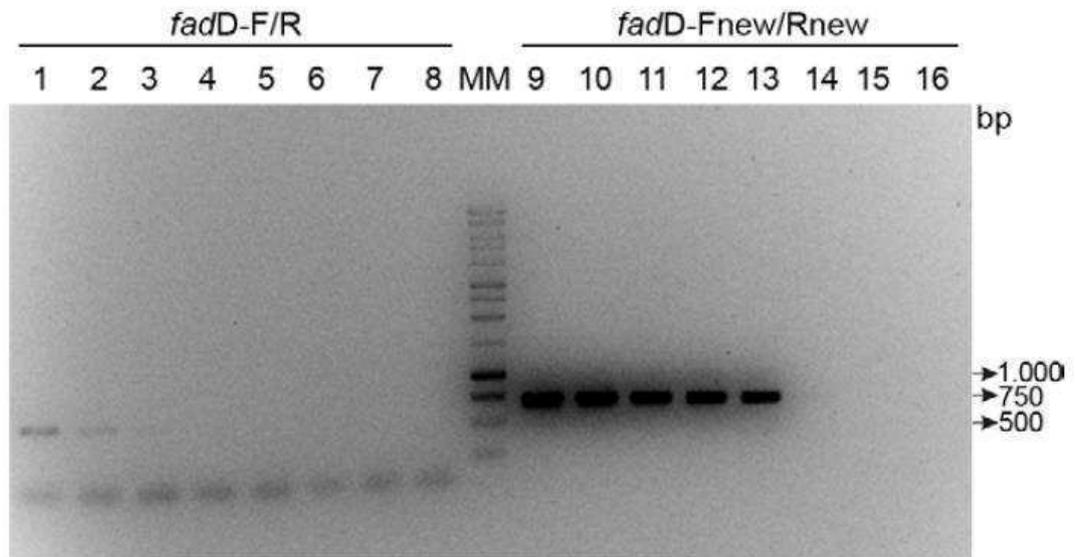


Figura 2. Sensibilidad analítica de los *primers* originales (*fadD-F/R*) y rediseñados (*fadD-Fnew/Rnew*) para el locus *fadD*. Se observan los productos de 577 pb amplificados con los *primers* *fadD-F/R* y de 700 pb amplificados con los *primers* *fadD-Fnew/Rnew*. Calles 1-7, 9-15: 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 1 ng, 1 pg, 1 fg; calles 8 y 16: controles negativos; MM: marcador molecular, 1kb (Promega, USA).

Los restantes seis genes incluidos en el esquema 7LT codifican para seis enzimas involucradas en vías metabólicas relacionadas con el metabolismo energético y la envoltura celular (Tabla 2).

Tabla 2. Localización de los seis genes en el cromosoma I de *Leptospira interrogans* cepa 56601. El tamaño total de este cromosoma es de 4.338,762 pb dentro de las cuales se encuentran distribuidos estos seis marcadores.

Gen	Función	Rol celular	Localización en el cromosoma I
<i>pntA</i>	NAD(P) transhidrogenasa subunidad alfa	Metabolismo energético: Transporte de electrones	56347-56871
<i>sucA</i>	Componente 2-oxoglutarato dehidrogenasa-decarboxilasa	Metabolismo energético: Ciclo TCA	1227474-1227920
<i>pfkB</i>	Riboquinasa	Metabolismo energético: azúcares	1386553-1386984
<i>tpiA</i>	Triosefosfato isomerasa	Metabolismo energético: Glicólisis/Gluconeogénesis	1694673-1694248
<i>mreA</i>	Proteína rodA (<i>Rod shape-determining protein rodA</i>)	Envoltura celular: Biosíntesis y degradación de peptidoglicanos	2734550-2734116
<i>glmU</i>	UDP-N-acetylglucosamina pirofosforilasa	Envoltura celular: Biosíntesis y degradación de polisacáridos y lipopolisacáridos de superficie	3784955-3784512

6.1.2. Tipificación por esquema 7LT

Se describieron 7 STs diferentes entre las 25 cepas tipificadas (Tabla 3). El ST predominante fue el ST37 que agrupó 14 de las 25 cepas, incluyendo aquellas de los serogrupos Pomona (el más abundante en la colección) y Canicola. Sin embargo, dos de las cepas Pomona presentaron STs nuevos (no descritos previamente en la base de datos), que fueron denominados inicialmente como STN1 y STN3. Éstos se relacionaron con el ST37, en seis de los siete loci, diferenciándose en las secuencias de los genes *pfkB* (STN1) y *glmU* (STN3) que presentaron nuevas variantes alélicas. El ST17 fue el segundo perfil alélico más abundante y describió a las cepas de serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (6 de 25), con excepción de la cepa 56601 perteneciente al serovar Lai, tipificada como ST1 con cuatro alelos diferentes (*sucA*, *tpiA*, *pfkB* y *mreA*).

Tabla 3. Tipificación mediante el esquema 7LT de 25 cepas y aislamientos. Los alelos fueron codificados ingresando las secuencias de los loci en la base de datos <http://leptospira.mlst.net/>.

Cepa	Serogrupo	<i>glmU</i>	<i>pntA</i>	<i>sucA</i>	<i>fadD</i>	<i>tpiA</i>	<i>pfkB</i>	<i>mreA</i>	ST
Fiocruz L1-130	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17
IcteroI	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17
RGA	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17
Lai 56601	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
Hond Utrecht IV*	Canicola	3	3	3	2	3	4	5	37
MY1039*	Canicola	3	3	3	2	3	4	5	37
Pomona*	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Marcos Juárez	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Fulton	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Longchamps	Pomona	Nuevo	3	3	2	3	4	5	STN3
Pujato	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Cañuelas I	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
San Alfredo I	Pomona	3	3	3	2	3	Nuevo	5	SNT1
Marcos Paz	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Cañuelas II	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Rojas	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
AK-RFB	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
V3P	Sejroe	3	3	3	2	3	4	5	37
Corrientes 266	Pomona	3	3	3	2	3	4	5	37
Comadreja	Canicola	3	3	3	2	3	4	5	37
3705 SENASA	Sejroe	9	1	2	1	4	13	9	58
3705 LiW-04-W1	Sejroe	9	1	2	1	4	10	4	STN2
La Cava 1	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17
Cañuelas III	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17
E3	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	2	1	2	10	4	17

Las dos cepas de serogrupo Sejroe incluidas presentaron diferentes STs: 3705 SENASA correspondió al ST58, mientras que 3705 LiW-04-W1 también presentó un ST nuevo, el STN2. A

diferencia de STN1 y STN3, el STN2 no se compuso de nuevos alelos sino que consistió en una nueva combinación de alelos ya conocidos presentes en el ST58 (*glmU*, *pntA*, *sucA*, *fadD* y *tpiA*) y el ST17 (*pfkB* y *mreA*).

6.1.3 Variabilidad y selección en los loci de MLST 7LT

En el conjunto de cepas analizado se describieron entre dos y cinco alelos para cada loci, siendo *pfkB* el locus más variable con cinco alelos seguido por *glmU*, *tpiA* y *mreA*, con cuatro alelos, *sucA* con tres alelos. Finalmente *pntA* y *fadD* fueron los menos variables en la colección con dos alelos cada uno. Como se observa en la Tabla 4, dichos alelos se definieron según un número variable de sustituciones nucleotídicas únicas o SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*). Concordante con el número de alelos, el locus *fadD* presentó 1 SNP seguido por *pntA* (3 SNPs), *sucA* y *mreA* (4 SNPs), *tpiA* (5 SNPs) y *pfkB* (6 SNPs). Finalmente, el locus *glmU* presentó 2 SNPs para los alelos ya descriptos en la base de datos (1, 3 y 9) mientras que el aislamiento argentino Longchamps, presentó 76 SNPs con respecto a los alelos 1, 3 y 9.

Tabla 4. Número de alelos y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) por loci del esquema 7LT.

Loci	Alelos	SNPs
<i>fadD</i>	2	1
<i>pntA</i>	2	3
<i>sucA</i>	3	4
<i>mreA</i>	4	4
<i>tpiA</i>	4	5
<i>glmU</i>	4	77
<i>pfkB</i>	5	6

La proporción entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) resultó menor a 1 indicando que las regiones génicas incluidas en el presente análisis estuvieron sujetas a selección estabilizadora, consistente con los requerimientos generales para loci de un esquema de MLST (Maiden 2006).

A pesar de haber obtenido variantes intraespecie e intraserogrupo, se obtuvo un bajo poder discriminatorio (0,65) del esquema 7LT aplicado a la colección descripta (índice de diversidad de Simpson). Asimismo se observó que 14 de las 25 cepas incluidas (56%) fueron indiferenciables ya que presentaron el mismo ST (ST37).

6.1.4. Análisis de asociación de STs del esquema 7LT

Los perfiles alélicos entre las 25 cepas se analizaron mediante el algoritmo goeBURST utilizando el software PHYLOViZ, que permite establecer la conformación de complejos clonales (CCs) entre los STs descritos (Francisco et al., 2012). La aplicación del esquema 7LT permitió un análisis enriquecido de CCs (Figura 3), pudiendo incluir en el mismo cepas obtenidas de la base de datos pertinente, que pertenecían a diversos STs serogrupos, orígenes geográficos y hospedadores (<http://leptospira.mlst.net.>). Se incluyeron 286 cepas de las especies *L. interrogans* (243) y *L. kirschneri* (14) que involucraron 15 serogrupos, 33 países, 18 hospedadores y una cepa de origen ambiental (agua). Como se observa en la Figura 3 el estudio de asociación de STs describió 6 CCs de los cuales 3 incluyeron únicamente cepas de la especie *L. interrogans* (CC0, CC4 y CC5) y 3 CCs a cepas de la especie *L. kirschneri* (CC1, CC2 y CC3).

Los 7 STs descritos en nuestra colección formaron parte del CC0, y dos de ellos (ST17 y ST37) resultaron genotipos fundadores siendo los más frecuentes en número de cepas y distribución geográfica. A pesar de esta amplia variabilidad, el ST17 describió únicamente cepas del serogrupo Icterohaemorrhagiae.

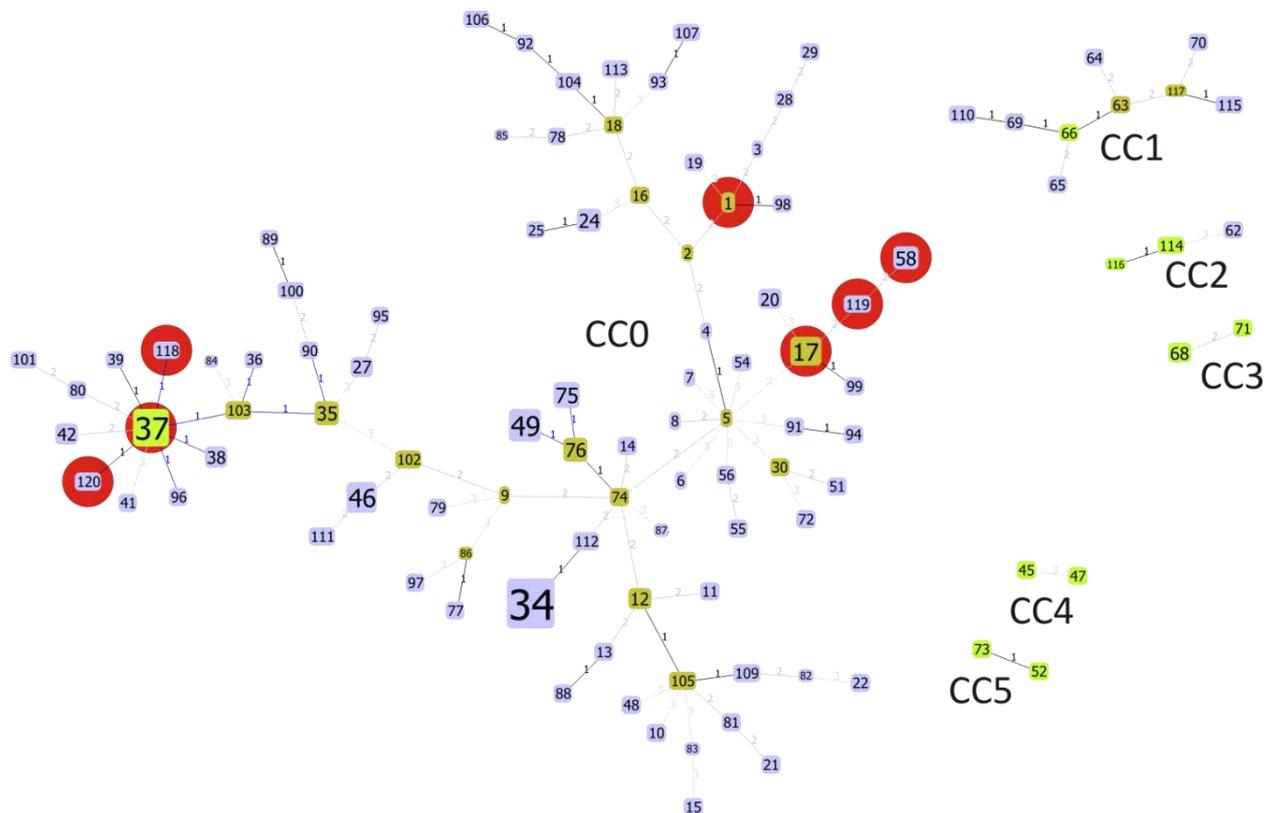


Figura 3. Análisis goeBURST del esquema 7LT. Se observan los 6 CCs y los STs de la colección estudiada formando parte del CC0 (círculos rojos). Los 6 CCs fueron construidos en función de conexiones entre STs que podían variar en un máximo de 3 alelos (TLVs). Los datos fueron extraídos de la base de datos <http://leptospira.mlst.net/> (actualmente la base de datos ha sido actualizada con otra composición de genes y esta información ya no se encuentra disponible). 118: STN1; 119: STN2; 120: STN3.

6.1.5. Relaciones filogenéticas entre los STs del esquema 7LT

Como una primera aproximación a las relaciones filogenéticas entre los STs que se obtuvieron en la colección de 25 aislamientos y cepas (Tabla 2), se realizó un análisis de máxima verosimilitud (ML) utilizando como *input* las secuencias concatenadas de los loci correspondientes a cada ST. El análisis ubicó a los STs en 3 grupos principales, parcialmente coincidentes con los serogrupos asociados a los mismos (Figura 4).

El ST58 y el ST119, ambos de serogrupo Sejroe, conformaron un *cluster* terminal con alto soporte de rama.

Si bien el ST1 y el ST17 correspondieron a cepas del mismo serogrupo (*Icterohaemorrhagiae*), las mismas difieren en sus serovares, Lai e *Icterohaemorrhagiae* respectivamente. En base a la topología obtenida, el ST1 representaría un genotipo intermedio entre el ST17 y el *cluster* del serogrupo Sejroe.

Otro agrupamiento terminal con alto soporte de rama fue definido por los genotipos ST37 y STN1, ambos asociados al serogrupo Pomona, aunque el ST37 también se asoció a Canicola. Estos dos serogrupos (Pomona y Canicola) compartieron el mismo perfil de MLST y no pudieron diferenciarse. A pesar de la asociación de STN3 con ST37 evidenciada en el análisis de goeBURST, el STN3 no se agrupó con su genotipo fundador. Esto pudo deberse al alto número de SNPs mapeados en el locus *glmU*.

El ST62 corresponde a un aislamiento de *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa que no formó parte de la colección, y al estar distanciado genéticamente se consideró como *outgroup* en el análisis.

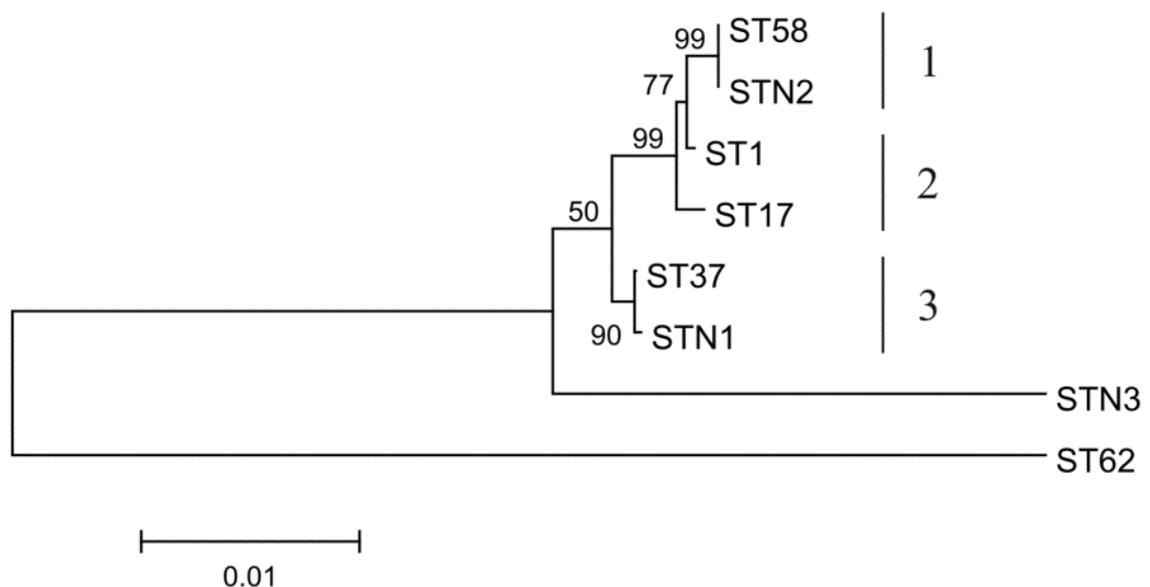


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre STs en base al método de máxima verosimilitud (ML), Kimura 2-parámetros, 500 replicas de *bootstrap*. El ST62 (obtenido a partir de la cepa Moskva V de *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa) se configuró como *outgroup*. Los números indican la asociación de los STs con los serogrupos Sejroe (1), Icterohaemorrhagiae (2), Canicola y Pomona (3). Una topología equivalente fue obtenida al analizar los mismos STs con el método Neighbor-Joining (NJ), Kimura-2-parámetros, 500 replicas de *bootstrap*.

6.2. Tipificación por MLVA

En base a los resultados descriptos para el conjunto de cepas argentinas tipificadas mediante 7LT, cuyo poder discriminatorio fue bajo, se procedió a la aplicación del método de tipificación de MLVA a fin de evaluar si esta técnica permitía obtener un incremento en dicho parámetro. Dado un conjunto de loci VNTRs distribuidos en el genoma, el MLVA consiste en la determinación del número de repeticiones de cada locus. Dicho número constituye un alelo, y

la combinatoria resultante entre los diferentes alelos determina el genotipo de la cepa. Para *Leptospira* se describió un set de VNTRs que permite tipificar cepas pertenecientes a las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri* (Majed et al. 2005). Debido a que en la colección analizada por 7LT todos los aislamientos pertenecían a *L. interrogans*, fue posible aplicar esta herramienta y explorar su poder discriminatorio.

La técnica se aplicó al mismo conjunto de aislamientos previamente tipificado por MLST 7LT. Se determinaron 9 genotipos diferentes de MLVA, que nombramos arbitrariamente por letras minúsculas, desde el genotipo "a" hasta el "i" (Tabla 5).

Tabla 5. Tipificación mediante VNTRs (MLVA) de 18 aislamientos argentinos y 7 cepas de referencia. Los genotipos fueron codificados de acuerdo al número de secuencias repetitivas presentes en cada locus, y asignando a cada combinación de alelos un perfil VNTR.

Cepa	Serogrupo	VNTR								Genotipo
		4	7	9	10	11	19	23	31	
Fiocruz L1-130	Icterohaemorrhagiae	2	1	13	7	1	2	0	3	a
IcteroI	Icterohaemorrhagiae	2	1	13	7	1	2	0	3	a
RGA	Icterohaemorrhagiae	2	1	13	7	1	2	0	3	a
Lai 56601	Icterohaemorrhagiae	5	3	4	2	4	6	5	4	h
Hond Utrecht IV*	Canicola	1	10	2	3	2	10	2	3	f
MY1039*	Canicola	1	10	2	3	2	10	2	4	i
Pomona*	Pomona	2	0	6	14	2	8	1	3	d
Marcos Juárez	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Fulton	Pomona	4	1	6	10	1	8	2	3	c
Longchamps	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Pujato	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Cañuelas I	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
San Alfredo I	Pomona	2	0	6	14	2	8	1	3	d
Marcos Paz	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Cañuelas II	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Rojas	Pomona	4	1	6	10	1	8	2	3	c
AK-RFB	Pomona	4	1	6	10	2	8	2	3	b
V3P	Sejroe	4	1	6	10	2	8	2	3	b
Corrientes 266	Pomona	1	10	2	3	2	10	2	4	i
Comadreja	Canicola	1	10	2	3	2	10	2	3	f
3705 SENASA	Sejroe	3	1	3	11	2	17	7	3	g
3705 LiW-04-W1	Sejroe	3	1	3	11	2	17	7	3	g
La Cava 1	Icterohaemorrhagiae	2	1	13	7	1	2	0	3	a
Cañuelas III	Icterohaemorrhagiae	2	1	13	7	2	2	0	3	e
E3	Icterohaemorrhagiae	1	10	2	3	2	10	2	3	f

El poder discriminatorio de la técnica aplicada a este conjunto de aislamientos, determinado por el índice de Simpson, fue de 0,86, mayor al obtenido para MLST 7LT, descrita en la sección

anterior. Las cepas de serogrupo *Icterohaemorrhagiae* se subdividieron en 4 genotipos: "a", "e", "h" y "f". El genotipo "a" agrupó 4 cepas: el aislamiento La Cava 1 junto con las cepas de referencia *Ictero I*, RGA y Fiocruz L1-130, mientras que el genotipo "e" fue único, representado por el aislamiento Cañuelas III.

En concordancia con la sección anterior, la cepa 56601 de serogrupo *Icterohaemorrhagiae* y serovar Lai se diferenció completamente de las otras cepas del mismo serogrupo y distinto serovar (*Icterohaemorrhagiae*). Dicha cepa presentó el perfil "h", que fue único en la colección. La excepción dentro del serogrupo fue el caso del aislamiento E3, que presentó genotipo "f", agrupándose de esta manera con cepas de un serogrupo diferente, *Canicola*: Hond Utrecht IV (cepa de referencia) y Comadreja (aislamiento).

Otras 2 cepas con serogrupo *Canicola* (Corrientes 266 y MY1039) compartieron el perfil "i". Los genotipos "b", "c" y "d" correspondieron a los aislamientos de serogrupo Pomona, donde el perfil "b" fue predominante conteniendo 9 de los 11 aislamientos Pomona. El aislamiento V3P, si bien se encontraba clasificado por MAT como perteneciente al serogrupo *Sejroe*, resultó con genotipo "b" coincidiendo con los aislamientos Pomona. Finalmente, los 2 aislamientos con serogrupo *Sejroe* presentaron genotipo "g".

6.3 Análisis combinado de STs y VNTRs: STVNTR

De acuerdo al índice de poder discriminatorio, se obtuvo mayor discriminación de las variantes genéticas mediante la utilización del método de MLVA. Sin embargo, y si bien se trata de una colección limitada, ambas estrategias agruparon en un mismo genotipo o perfil alélico el 36% y el 56% de las cepas respectivamente y a su vez, ambos métodos presentaron dificultades para diferenciar cepas pertenecientes a un determinado serogrupo. En el caso de MLST, los serogrupos Pomona y *Canicola* no fueron diferenciables por presentar el mismo perfil alélico. Mediante la tipificación por VNTRs no se pudieron distinguir cepas de los serogrupos *Icterohaemorrhagiae* y *Canicola*. Teniendo en cuenta estas dificultades, se exploró una alternativa para alcanzar un mayor poder discriminatorio.

Los genotipos de VNTR se combinaron con los perfiles alélicos de MLST para generar un nuevo código: STVNTR (Tabla 6), el cual describió 13 patrones diferentes, implicando un aumento del poder discriminatorio. Así, para la misma colección de cepas donde se describieron siete STs y

nueve VNTRs, bajo esta alternativa se generaron 13 STVNTRs, aumentando el valor del poder discriminatorio de 0.65 a 0.86 y finalmente a 0.9, respectivamente.

Tabla 6. Tipificación molecular de la colección de cepas mediante la combinación de las estrategias MLST (ST) y MLVA (VNTR). *Perfiles obtenidos de bibliografía. **: Confirmación de serogrupo a partir de los resultados de tipificación molecular. ND: no determinado.

Cepa	Serogrupo	Serovar	ST	VNTR	STVNTR
Fiocruz L1-130	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	17	a	A
IcteroI	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	17	a	A
RGA	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	17	a	A
Lai 56601	Icterohaemorrhagiae	Lai	1	h	K
Hond Utrecht IV*	Canicola	Canicola	37	f	H
MY1039*	Canicola	Portlandvere	37	i	L
Pomona*	Pomona	Pomona	37	d	M
Marcos Juárez	Pomona	ND	37	b	B
Fulton	Pomona	ND	37	c	C
Longchamps	Pomona	ND	STN3	b	D
Pujato	Pomona	ND	37	b	B
Cañuelas I	Pomona	ND	37	b	B
San Alfredo I	Pomona	ND	SNT1	d	E
Marcos Paz	Pomona	ND	37	b	B
Cañuelas II	Pomona	ND	37	b	1
Rojas	Pomona	ND	37	c	1
AK-RFB	Pomona	ND	37	b	1
V3P	Pomona**	ND	37	b	1
Corrientes 266	Canicola**	ND	37	i	10
Comadreja	Canicola	ND	37	f	10
3705 SENASA	Sejroe	ND	58	g	1
3705 LiW-04-W1	Sejroe**	ND	STN2	g	1
La Cava 1	Icterohaemorrhagiae	ND	17	a	1
Cañuelas III	Icterohaemorrhagiae	ND	17	e	1
E3	Icterohaemorrhagiae	ND	17	f	10

Este genotipo combinado se sometió a un análisis filogenético de Máxima Parsimonia a partir de una matriz de datos con 25 taxones (cepas) y 15 caracteres (7 loci de MLST y 8 loci de MLVA). El árbol filogenético resultante (Figura 5) presentó 4 agrupamientos o *clusters*, cada uno conteniendo cepas clasificadas en el mismo serogrupo, e incluso permitió reconfirmar los resultados obtenidos por las metodologías separadas respecto de la clasificación de tres cepas su serotipificación era ambigua.

Tal como se observa en la Figura 5 los *clusters* se correspondieron con los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Canicola y Pomona. El aislamiento Corrientes 266 había sido inicialmente clasificado por MAT en el serogrupo Pomona; sin embargo mediante esta

metodología agrupó con cepas de serogrupo Canicola. El aislamiento V3P fue agrupado con cepas Pomona difiriendo de su clasificación por MAT que lo identificó como perteneciente al serogrupo Sejroe. En el caso de la cepa 3705 LiW-04-W1 se confirmó el serogrupo Sejroe, dado que la clasificación serológica no estaba confirmada.

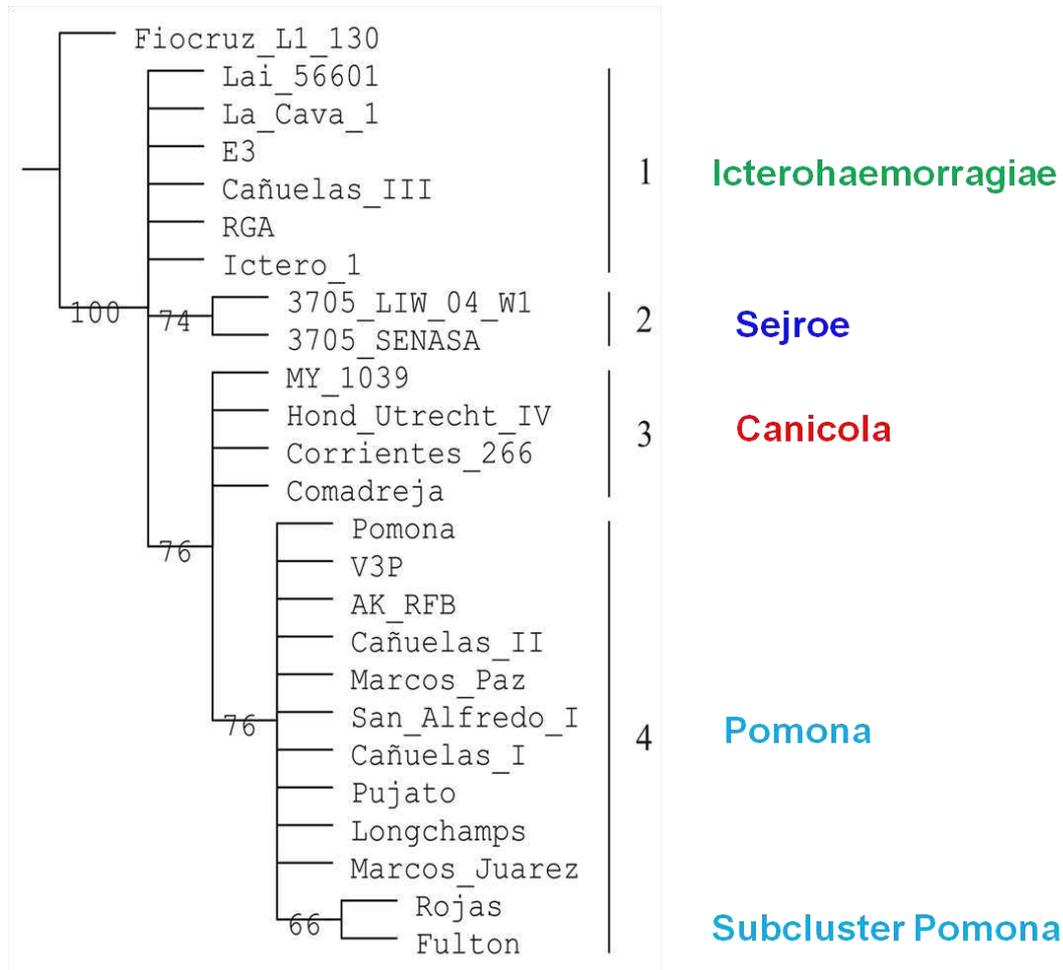


Figura 5. Cladograma generado por el análisis de máxima parsimonia (MP) a partir de la codificación combinada (STVNTR) que consistió en 7 loci MLST y 8 loci VNTR. Se realizó una búsqueda heurística tradicional, utilizando al algoritmo de intercambio de ramas TRB (Tree Bisection-Reconnection) con 100 réplicas. El soporte de rama fue evaluado mediante 500 réplicas bootstrap. Los *clusters* formados se correspondieron con los serogrupos de los aislamientos, indicados como: 1, Icterohaemorrhagiae; 2, Sejroe; 3, Canicola; 4, Pomona.

Resultados - Capítulo 2

Reevaluación de esquemas de MLST

En función de lo descrito en la sección anterior, los primeros resultados de tipificación obtenidos para la colección inicial de 25 cepas arrojaron un poder discriminatorio mayor al combinar la técnica de MLST con la de MLVA. Sin embargo, la implementación de estas técnicas en paralelo para una colección más numerosa de cepas sería muy laborioso, y poco aplicable si se quiere para la tipificación de *Leptospira* en forma rutinaria. Por otra parte, tanto el esquema de MLST utilizado (7LT, Thaipadungpanit et al., 2007) como el de MLVA (Majed et al., 2008) fueron desarrollados únicamente para la caracterización de dos especies del género, *L. interrogans* y *L. kirschneri*, mientras que existen otras 5 especies patógenas (*L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. noguchii* y *L. alexanderi*) relevantes en salud pública y sanidad animal que deberían considerarse al estudiar la epidemiología de la enfermedad. La relevancia de diseñar esquemas más permisivos en cuanto a la posibilidad de incluir la totalidad de las especies patógenas llevó a los autores del esquema 7LT a diseñar nuevamente dicho esquema de manera de lograr este objetivo (Boonsilp et al., 2013). Por otro lado y previo a esta optimización, en 2006 Ahmed y colaboradores en Holanda (6LH, Ahmed et al., 2006) publicaron una esquema de 6 loci inclusivo para las 7 especies patógenas pero sin hacer públicas las secuencias del mismo. Esto generó una gran dificultad en su aplicación.

6.4 Evaluación de esquemas de MLST

El siguiente objetivo fue generar un esquema de MLST con mayor poder discriminatorio que 7LT pero sin la necesidad de incluir en el análisis la estrategia de MLVA, de manera de poder comparar marcadores con tiempos evolutivos similares e incluir los mismos en una única base de datos.

Con el antecedente del bajo poder discriminatorio obtenido con el esquema 7LT principalmente para la descripción de variantes genéticas intraespecie (*L. interrogans*), se propuso evaluar en paralelo los genes de los esquemas 7LT y 6LH para una misma colección de cepas, con el enfoque de extraer entre los mismos un diseño de MLST optimizado. Para ello se obtuvieron las secuencias correspondientes al esquema 6LH mediante el contacto directo con los autores del trabajo.

6.4.1 Tipificación mediante 12 loci

El conjunto de cepas utilizado para esta primer fase del análisis se conformó de 17 aislamientos argentinos sumados a 48 cepas de distintos orígenes geográficos, para las cuales se obtuvieron las correspondientes secuencias a partir de bases de datos o solicitándolas a sus autores. Las cepas incluidas en esta colección pertenecieron a las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri* (Tabla 2, Anexo).

De esta manera, la evaluación de ambos esquemas de MLST (7LT y 6LH) se realizó utilizando 12 de los 13 loci totales. El locus excluido de este análisis fue *secY* debido a que la mayor parte de las cepas evaluadas por el grupo holandés, carecía de la secuencia del mismo. Por lo tanto, la inclusión de *secY* reducía significativamente el número de cepas para el análisis. Se sumaron entonces, 5 cinco de los seis genes (Tabla 7) del esquema 6LH a los siete genes del esquema 7LT para el análisis de la colección mencionada, mayor a la analizada previamente

Tabla 7. Localización de los seis genes en el cromosoma I de *Leptospira interrogans* cepa 56601. El tamaño total de este cromosoma es de 4.338,762 pb dentro de las cuales se encuentran distribuidos los seis marcadores del esquema 6LH

Gen	Función	Rol celular	Localización en el cromosoma I
<i>adk</i>	Adenilato ciclasa	Metabolismo energético	3458298–3458861
<i>icdA</i>	Isocitrato dehidrogenasa	Metabolismo oxidativo	3979829–3981025
<i>lipL32</i>	Lipoproteína lipL32 de membrana externa	Proteína de superficie	1666299–1667117
<i>lipL41</i>	Lipoproteína lipL41 de membrana externa	Proteína de superficie	3603575–3604642
<i>rrs2</i>	16S ARNr	Función ribosomal	1862433–1863944

La variabilidad genética de los 12 loci en las 65 cepas permitió describir 57 STs frente a los 45 o 53 STs de los esquemas individuales [7LT y 6LH(-*secY*), respectivamente. El aumento en el número de STs implicó un incremento en el poder discriminatorio a 0.993 frente a 0.957 del esquema 7LT y 0.986 del esquema 6LH (excluyendo el locus *secY*). Estos 57 STs fueron descritos entonces con 12 loci siendo *fadD* el menos variable (9 alelos) y *adk* el más variable(28 alelos).

6.4.1.1. Análisis de Asociación de STs del esquema 12L

Siguiendo la misma metodología que con el esquema 7LT el análisis de asociación de STs se realizó mediante el método goeBURST. Como se observa en la Figura 6 se establecieron seis complejos clonales (CCs) formados por la asociación entre STs variables en uno a tres loci (SLVs, DLVs y TLVs, respectivamente), incluyendo 35 *singletons*.

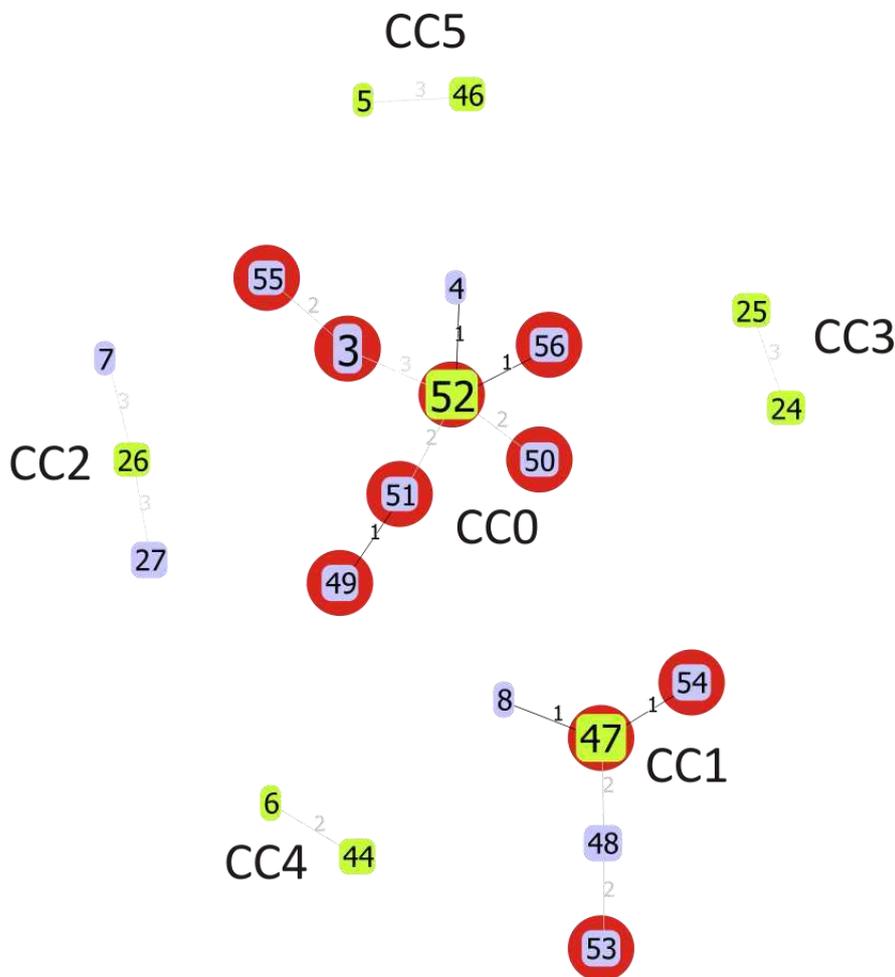


Figura 6. Análisis goeBURST incluyendo 12 loci. Los STs de las cepas argentinas forman parte de los CCs 1 y 2 (círculos rojos). Los CCs fueron construidos a partir de conexiones entre STs permitiendo hasta 3 variantes alélicas (TLVs), en función de los alelos codificados según la Tabla 2 (Anexo).

Se observaron dos CCs que vincularon mayor número de STs, incluyendo dos de los tres STs más frecuentes en la colección, ST47 (3 cepas) y ST52 (4 cepas) como genotipos fundadores. Todos los aislamientos argentinos formaron parte de estos dos CCs revelando una estrecha relación entre los mismos. El CC0 lo conformaron cepas de los serogrupos Pomona, Canicola y Sejroe mientras que en el CC1 se observó un 100% de correlación con el serogrupo

Icterohaemorrhagiae. Los datos previos apoyan a Icterohaemorrhagiae como el serogrupo más frecuentemente asociado con infecciones humanas en Argentina, y al serogrupo Pomona asociado principalmente con infección en cerdos y bovinos (Pavan et al., 2008).

6.4.1.2. Relaciones filogenéticas entre los STs del esquema 12L

La reconstrucción filogenética realizada a partir las secuencias concatenadas de los 12 loci permitió la discriminación de las cepas a nivel de especie, ya que las dos especies incluidas (*L. interrogans* y *L. kirschneri*) fueron asignadas a dos *clusters* principales (Figura 7). Notablemente, dentro del *cluster* correspondiente a *L. interrogans* se observó agrupamiento entre cepas pertenecientes al mismo serogrupo, particularmente para los serogrupos predominantes Pomona e Icterohaemorrhagiae, correspondientes en su mayoría a aislamientos de Argentina. Estos *subclusters* presentaron un alto soporte de rama, de 98 y 70 respectivamente.

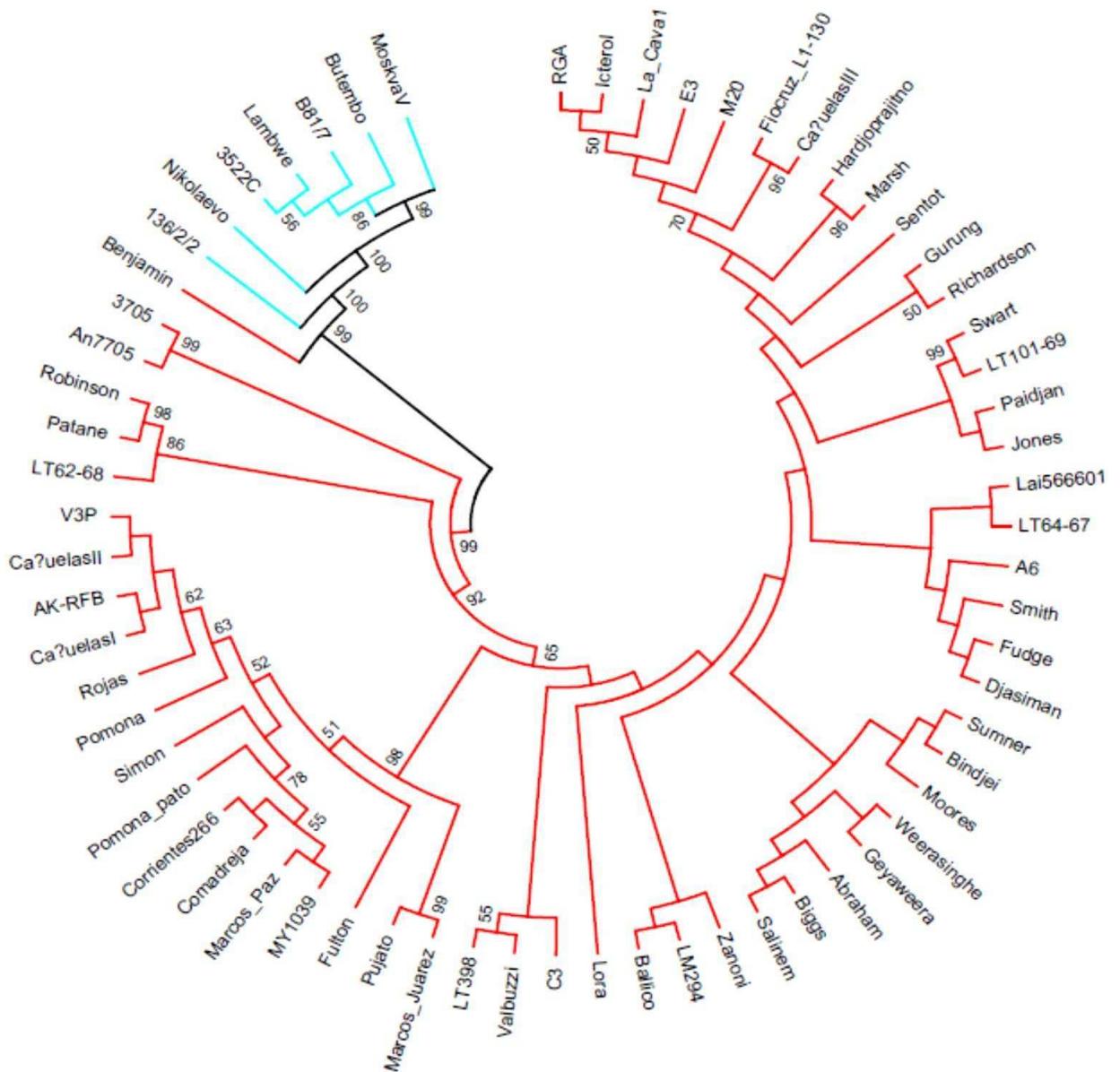


Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud en base a las secuencias concatenadas de 12 loci, incluyendo 65 cepas. Se observaron dos *clusters* principales, correspondientes a las cepas de cada una de las especies incluidas, *L. interrogans* (rojo) y *L. kirschneri* (celeste).

6.4.2. Optimización del esquema

Con el objeto de optimizar el esquema de MLST a partir de 12 loci iniciales, el software MLSTest realizó 924 combinaciones diferentes entre los loci, evaluando en cada caso el número máximo de STs obtenidos. Se encontraron 4 posibles esquemas (combinaciones) optimizados de 6 loci cada uno, que produjeron 57 STs (el mismo número generado por 12 loci). En la Tabla 8 se presentan las 4 combinaciones sugeridas por el software.

Tabla 8. Esquemas posibles de 6 loci que generaron el mismo número de STs (57) que con el total de 12 loci. Cada locus se identificó de un color diferente. Se observa que los loci *adk*, *icdA*, *lipL32* y *mreA* (resaltados en negrita) están presentes en todas las combinaciones.

	Combinación			
	1	2	3	4
Loci	<i>adk</i>	<i>adk</i>	<i>adk</i>	<i>adk</i>
	<i>glmU</i>	<i>glmU</i>	<i>icdA</i>	<i>icdA</i>
	<i>icdA</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL32</i>
	<i>lipL32</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>mreA</i>
	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>mreA</i>	<i>rrs2</i>
	<i>mreA</i>	<i>mreA</i>	<i>pntA</i>	<i>pntA</i>

Los loci involucrados en estas combinaciones fueron ocho en total, cinco originales del esquema 6LH y 3 del esquema 7LT. Se observó que cuatro loci (*adk*, *icdA*, *lipL32* y *mreA*) estaban presentes en todas las combinaciones propuestas, mientras que otros cuatro aparecían sólo en algunas de ellas (*glmU*, *lipL41*, *rrs2* y *pntA*). En base a esta selección, los ocho loci se compararon mediante distintos parámetros indicadores de diversidad y utilidad para MLST, los cuales se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros analizados en un subconjunto de 65 cepas para la selección de los loci óptimos. Los números subrayados indican valores discordantes para los parámetros del locus *rrs2*. CCs: complejos clonales.

Parámetros/loci	<i>adk</i>	<i>glmU</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>mreA</i>	<i>pntA</i>	<i>rrs2</i>
N° de alelos	28	14	21	10	26	17	16	14
N° de polimorfismos	106	38	81	31	84	44	51	18
Eficiencia de Tipificación (ET)	0,264	0,368	0,259	0,322	0,309	0,386	0,313	<u>0,777</u>
Poder discriminatorio (PD)	0,833	0,765	0,744	0,654	0,941	0,866	0,756	<u>0,735</u>
dN/dS	0,0469	0,0531	0,012	0,055	0,052	0,007	0,0082	<u>1,3153</u>
goeBURST (N° CCs)	5	1	3	2	5	2	0	5

El locus *adk* se destacó por presentar el mayor número de alelos (28) y el número más alto de polimorfismos (106). Sin embargo la eficiencia de tipificación, que se define como el número de genotipos diferentes por sitio polimórfico fue relativamente baja y similar para todos los loci,

con excepción de *rrs2*. En este caso si bien se encontraron pocos alelos y polimorfismos, la eficiencia de tipificación fue más alta y se acercó al 1. El poder discriminatorio (PD) también fue homogéneo entre los loci, siendo *lipL41* el locus que arrojó un PD mayor, y *rrs2* presentó el PD más bajo. El valor de dN/dS (sustituciones sinónimas vs. no sinónimas) para *rrs2* fue mayor a 1, indicando que esta región génica está sujeta a selección positiva, lo que puede interferir en la señal de estudios filogenéticos.

En base al análisis de los parámetros inferidos para cada locus, tuvimos en el esquema final siete de los ocho loci involucrados en las combinaciones, excluyendo únicamente al locus *rrs2* en base a los parámetros obtenidos que no concuerda con lo deseable para un esquema de MLST (Maiden et al., 1998).

El nuevo esquema o 7LA (Argentina) consistió en los loci *adk*, *glmU*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *mreA* y *pntA*. Si bien los esquemas propuestos por el MLSTest consistían en 6 loci, es frecuente encontrar 7 loci en los esquemas de MLST. La finalidad de retener los 7 loci fue la de maximizar el poder de discriminación al evaluar el esquema en colecciones con un mayor número de cepas. En la Tabla 10 se muestra una comparación de los principales parámetros entre los diferentes esquemas de MLST en la que se resalta la optimización en eficiencia de tipificación y poder discriminatorio del esquema 7LA. Se observa que 7LA posibilita la tipificación molecular de un mismo número de cepas obteniendo parámetros de variabilidad comparables al esquema 12L.

Tabla 10. Comparación de parámetros de tipificación entre los diferentes esquemas de MLST.

Parámetros de tipificación/Esquema	7LT	6LH (-secY)	12L	7LA
Número de alelos	45	53	57	57
Número de Polimorfismos	285	320	605	435
Eficiencia de Tipificación	0.404	0.309	0.354	0.303
Poder Discriminatorio	0.957	0.986	0.993	0.993

6.4.3. Aplicación del esquema 7LA

Con el objeto de poner a prueba el esquema planteado, se amplió la colección de 65 cepas analizadas a un total de 116 cepas. Las secuencias correspondientes a las cepas adicionales constituyeron nuevas incorporaciones a las bases de datos mencionadas previamente (Boonsilp

et al., 2013). Fundamentalmente, estas inclusiones permitieron la expansión del análisis a cepas pertenecientes a las 7 principales especies patógenas de *Leptospira*, a diferencia de los conjuntos de cepas previos que incluyeron una o dos especies patógenas (Tabla 5, Anexo).

6.4.3.1. Parámetros de diversidad

Se describieron 96 perfiles alélicos en esta colección, con un poder discriminatorio global de 0,83. Al calcular nuevamente los parámetros estudiados para la selección de los loci, obtuvimos un número mayor de alelos y polimorfismos por locus. La eficiencia de tipificación aumentó ligeramente en la mayoría de los loci, salvo para *glmU* y *mreA* donde fue algo menor (Tabla 11). El poder discriminatorio se incrementó para todos los loci, oscilando entre los valores 0,837 (*lipL32*) y 0,959 (*lipL41*). Como era esperado, el valor de dN/dS fue menor a 1 en todos los casos.

Tabla 11. Parámetros analizados en 116 aislamientos para el esquema 7LA.CCs: Complejos clonales.

Parámetros/loci	<i>adk</i>	<i>glmU</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>mreA</i>	<i>pntA</i>
N° de alelos	54	31	45	33	49	38	35
N° de polimorfismos	135	138	147	51	109	136	157
Eficiencia de Tipificación (ET)	0,4	0,225	0,306	0,647	0,45	0,279	0,223
Poder discriminatorio (PD)	0,901	0,863	0,865	0,837	0,959	0,916	0,87
dN/dS	0,0415	0,0614	0,0177	0,0644	0,0522	0,0256	0,0141
goeBURST (N° CCs)	4	2	7	4	5	4	1

6.4.3.2. Análisis de Asociación de STs del esquema 7LA

Los resultados de goeBURST mostraron que las especies están confinadas dentro de diferentes complejos clonales (CCs), no habiendo coexistencia de cepas de diferentes especies en el mismo complejo clonal (Figura 8). Este resultado proporciona robustez a la evaluación del esquema 7LA. El análisis estableció 35 *singletons* (STs que no participan en CCs) y ocho CCs asociando los STs por variantes de 3 loci (TLVs).

El CC principal (*L. interrogans*) incluyó 59 cepas, vinculando 40 de los 96 STs. Este complejo incluyó al ST47 y al ST52, genotipos fundadores de dos CCs en el análisis previo del esquema 12L. En este caso también se observaron asociaciones entre los STs 47, 52 y 3 (*L. interrogans*),

que involucraron al mayor número de aislamientos y aparecieron como genotipos centrales de subcomplejos dentro del complejo clonal principal. El ST52 agrupó 8 aislamientos sólo de Argentina (Figura 8,a). Éstos se obtuvieron de bovinos (4 aislamientos), porcinos (2), rata (1) y humano (1) (Figura 8,b). Una variante de triple loci del ST52, el ST3, agrupó 7 aislamientos de diferentes fuentes incluyendo 5 de ganado bovino, cerdos y una comadreja (todos de Argentina) y 2 cepas de Estados Unidos y Jamaica, esta última corresponde a la cepa de referencia MY1039. Ambos STs, 52 y 3, se asociaron a otros STs que aparecieron en aislamientos de Argentina. El ST47 agrupó 7 aislamientos, 5 de Argentina incluyendo hospedadores salvajes y domésticos como zorro, ratas, perro, y un aislamiento de agua (Figura 8, a y b). Los 2 restantes fueron las cepas de referencia RGA e Ictero I aisladas de humanos en Bélgica y Japón respectivamente. El ST47 se diferenció de los anteriores por estar vinculado a STs provenientes de cepas de diversos orígenes geográficos, tales como Malasia, Brasil y Dinamarca, aisladas principalmente de humanos y roedores.

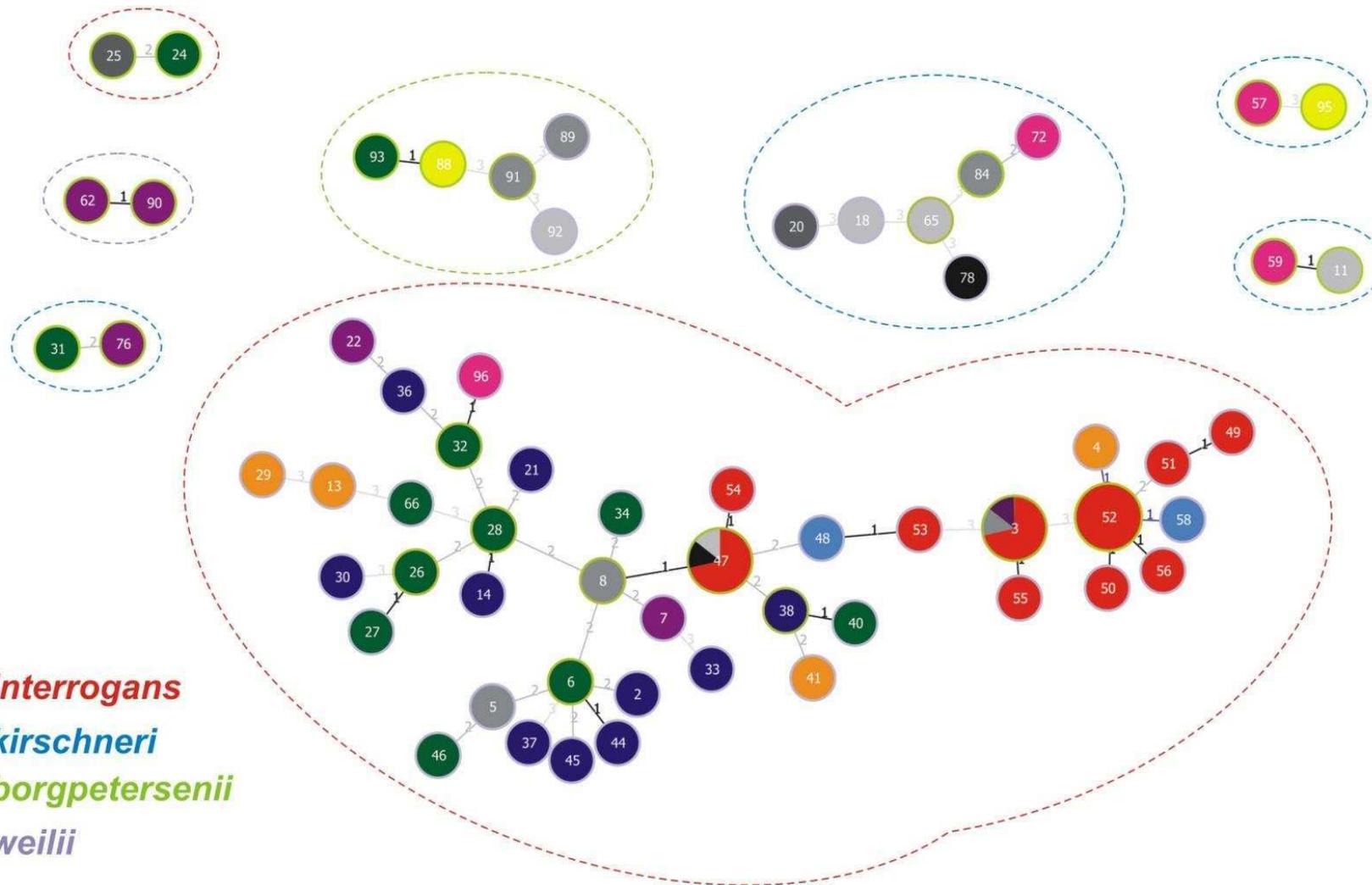


Figura 8.a. Asociaciones entre STs en 4 especies patógenas de *Leptospira* de acuerdo al esquema 7LA. Se excluyeron los *singletons*. Las líneas punteadas indican la especie de *Leptospira* agrupada en cada CC. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas incluidas; los colores indican el país de origen: rojo, Argentina; verde, Indonesia; azul, Malasia; celeste, Brasil; naranja, Australia; púrpura, China; violeta (ST3), EE.UU.; rosa, Rusia; amarillo, Sri Lanka; gris claro (ST11), Bulgaria; gris claro (ST18 y ST65), Zaire; gris claro, Bélgica (ST47), Checoslovaquia (ST92); gris medio, Jamaica (ST3 y ST84), Rumania (ST5), Dinamarca (ST8); gris oscuro, Kenia (ST20), Filipinas (ST25); negro, Japón (ST47), Israel (ST78).

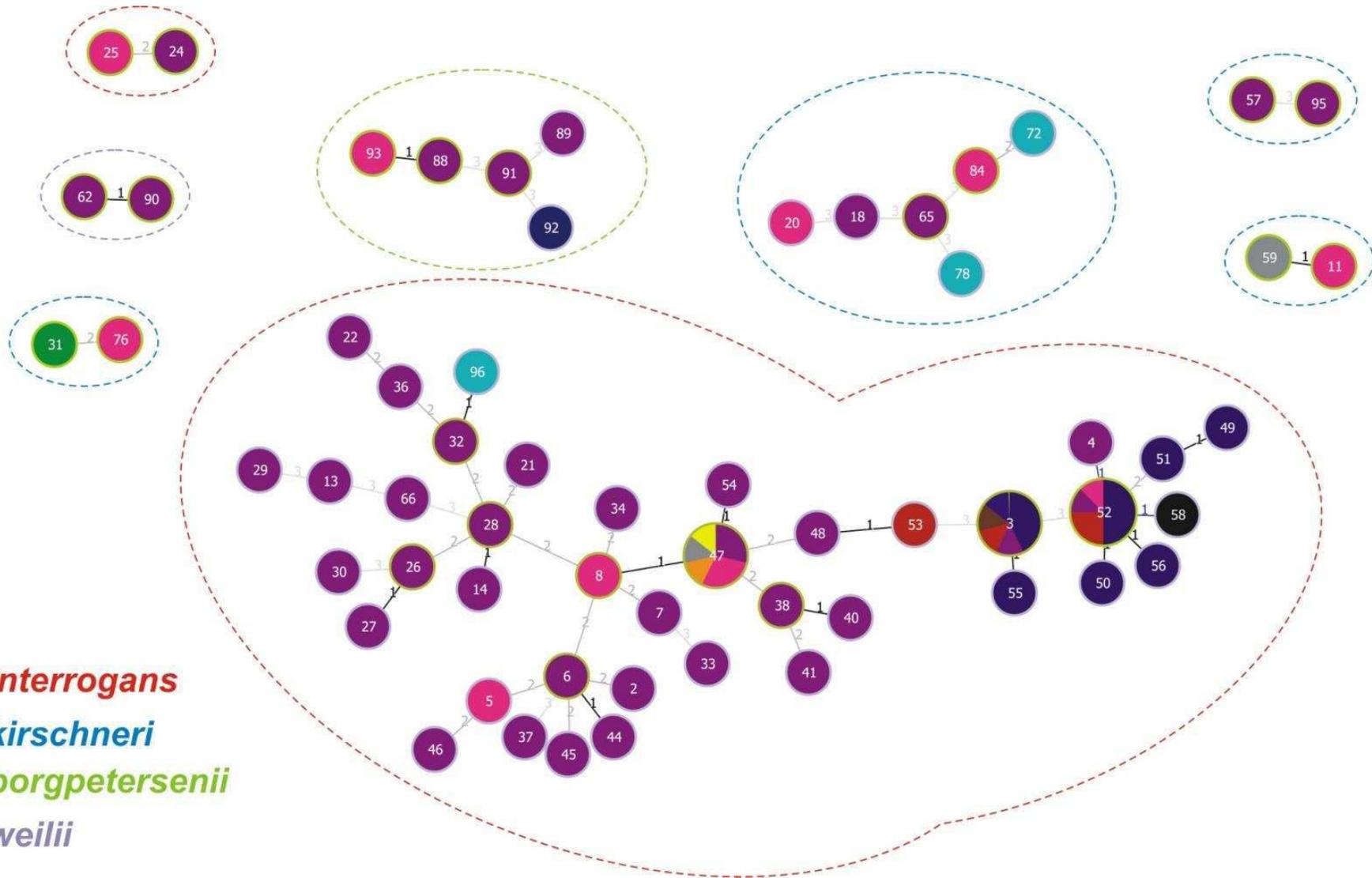


Figura 8.b. Los colores de los círculos indican el hospedador o fuente del aislamiento: azul, bovino; púrpura, humano; marrón, comadreja; rosa, rata; naranja oscuro, porcino; naranja claro, perro; gris, zarigüeya; amarillo, agua.

6.4.3.3. Relaciones filogenéticas entre los STs del esquema 7LA

Para evaluar las relaciones filogenéticas entre las cepas mediante el nuevo esquema de MLST, se concatenaron las secuencias correspondientes a los genes seleccionados en el siguiente orden: *adk* - *glmU* - *icdA* - *lipL32* - *lipL41* - *mreA* - *pntA*. A partir del concatenado, se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud. El dendrograma generado presentó 6 *clusters* que coincidieron con las especies incluidas en la colección (Figura 9).

Entre los *clusters* que agruparon aislamientos de la misma especie el mayor fue el correspondiente a *L. interrogans*, que presentó un nodo común con las cepas correspondientes a *L. kirschneri* y *L. noguchii*. Sin embargo las cepas Benjamin, 136/2/2 y Vleermius 90C no se agruparon dentro del *cluster* principal de *L. interrogans*, sino que fueron parafiléticas a las cepas de la especie *L. kirschneri*. Coincidentemente estas tres cepas pertenecían serogrupo Canicola. Otra excepción fue la de la cepa An7705, la cual no sólo se diferenció del resto de las cepas *L. interrogans*, sino que no fue incluida en ninguno de los *clusters* de especies. Esta cepa presentó un perfil alélico único, el ST10, compartiendo solo 3 de los 7 alelos con las cepas de *L. interrogans* (*glmU*, *mreA* y *pntA*). Estos alelos aparecen además en los STs más frecuentes en *L. interrogans*, ST52 y ST3, lo que evidencia la conexión de esta cepa con la mayoría de la especie a pesar de su ubicación aislada en el árbol. Sin embargo, en este caso se debe considerar la posibilidad de una clasificación errónea del aislamiento en la base de datos.

Los aislamientos argentinos se distribuyeron dentro del *cluster* de *L. interrogans* y estuvieron asociados a los STs que agrupaban el mayor número de cepas (ST47, ST52 y ST3). En el caso de *L. alexanderi* sólo incluimos una cepa en la colección que se agrupó junto a las cepas de *L. borgpetersenii*.

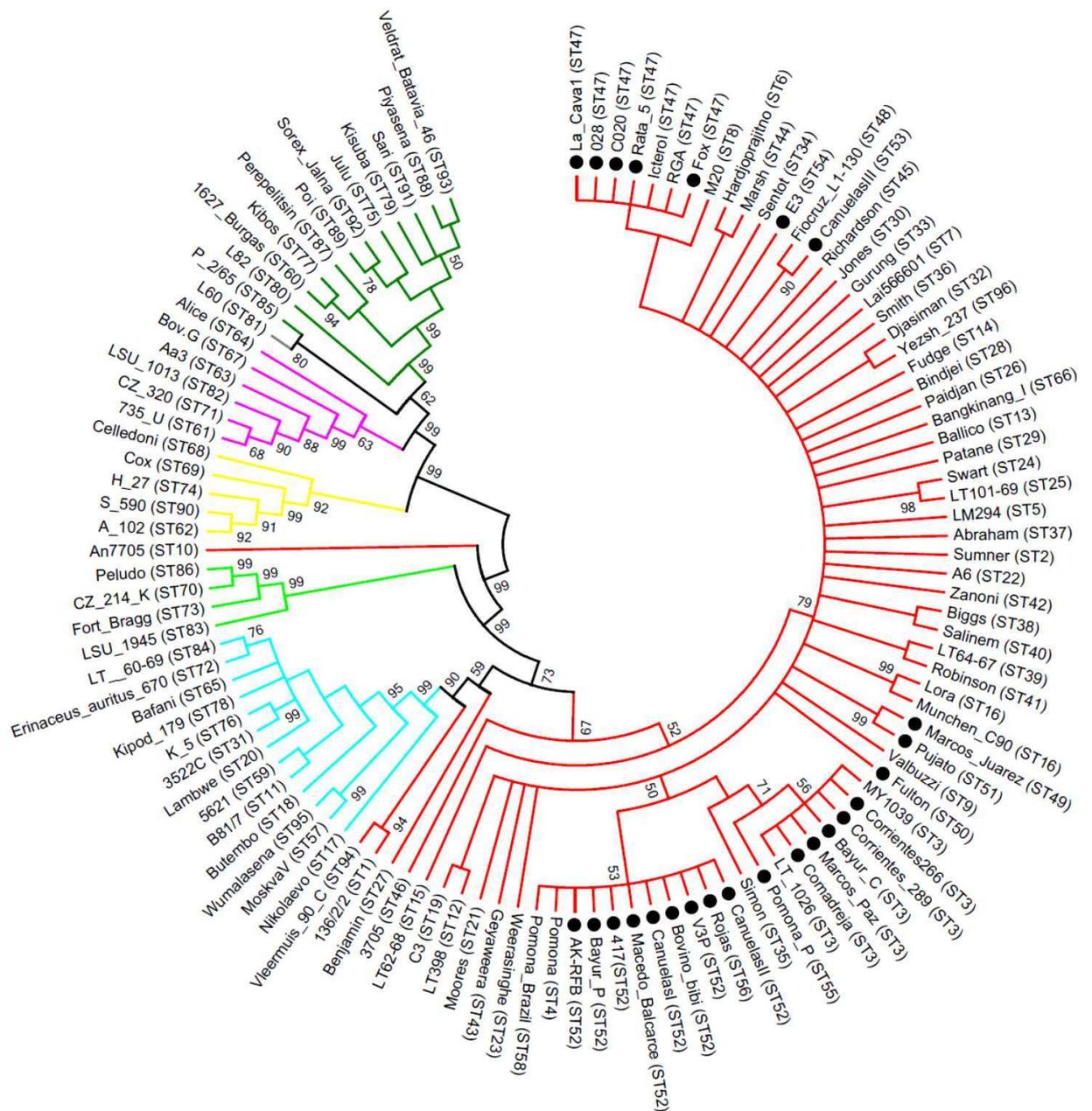


Figura 9. Árbol construido con las secuencias concatenadas correspondientes al esquema de 7 loci, utilizando 116 cepas. Se observan 6 *clusters* principales, cada uno agrupando a las cepas correspondientes a 6 especies patógenas de *Leptospira*. Cada agrupamiento por especie se indica de un color diferente: Rojo, *L. interrogans*; celeste, *L. kirschneri*; verde claro, *L. noguchii*; amarillo, *L. weilii*; rosa, *L. santarosai*; verde oscuro, *L. borgpetersenii*. La única cepa de la colección perteneciente a *L. alexanderi* (gris) se agrupó junto a *L. borgpetersenii*. Los STs se muestran entre paréntesis, y aislamientos argentinos se indican con puntos negros.

Se exploró también la contribución individual y congruencia de los loci a las relaciones genéticas entre las cepas mediante la construcción de árboles filogenéticos individuales para cada locus. Se obtuvieron siete árboles utilizando la misma metodología (máxima

verosimilitud), y en la mayoría se diferenciaron agrupamientos entre cepas de la misma especie (Figura 10 a, b, c y d).

Notablemente, en los árboles de *glmU* y *pntA* se definieron siete *clusters* dado que la cepa única de *L. alexanderi* (que previamente se había agrupado con *L. borgpetersenii*) se diferenció en una rama separada de las otras especies (Figura 10, a y d)

Los árboles generados por *adk* e *icdA* no presentaron alto soporte de las relaciones entre especies, dado que si bien la topología general se conservó (particularmente para *L. interrogans* que incluyó la mayoría de las cepas), ciertos aislamientos de una misma especie resultaron parafiléticos (Figura 10, a y b). Si bien esta incongruencia pudo introducir discrepancias a la filogenia del esquema total (concatenado de los loci) los parámetros estudiados previamente indicaron que estos loci eran buenos candidatos para tipificación, por presentar alta variabilidad y contribuir a la definición de complejos clonales, por lo tanto se conservaron en el esquema.

Los árboles generados para *lipL32* y *lipL41* no presentaron *clusters* de especies soportados como en los otros casos, posiblemente debido a que no constituyen genes *housekeeping*, sino que codifican para lipoproteínas de membrana que son menos conservadas, siendo mayor su tasa de variabilidad (Figura 10, b y c). En ambos casos los aislamientos argentinos se distribuyeron en ramas aisladas, junto con otras cepas de *L. interrogans*. Teniendo en cuenta estas observaciones, el criterio de inclusión de estos loci en el nuevo esquema fue el de considerar que podrían aportar variabilidad y proporcionar una mayor discriminación a nivel intraespecífico.

Las discrepancias en la clasificación de cepas que se habían observado para la filogenia del esquema total (secuencias concatenadas) se mantuvieron al analizar los árboles individuales. En el caso de la cepa An7705, habiendo sido clasificada en trabajos previos como *L. interrogans*, fue agrupada junto a las cepas de *L. santarosai* en los árboles de *adk*, *icdA*, *lipL32* y *lipL41*. El mismo resultado había sido obtenido por Ahmed y col. (2006), y es esperable ya que los 4 loci mencionados provienen del esquema holandés (6LH). Sin embargo, en los árboles de los loci *glmU*, *mreA* y *pntA* An7705 fue incluida en el *cluster* de *L. interrogans*, dado que estos tres alelos, como se mencionó previamente, son compartidos con la mayoría de las cepas de dicha especie. El mismo resultado fue obtenido por los autores Thaipadungpanit y col. (2007) y Boonsilp y col. (2013) para el esquema tailandés del que forman parte los tres loci.

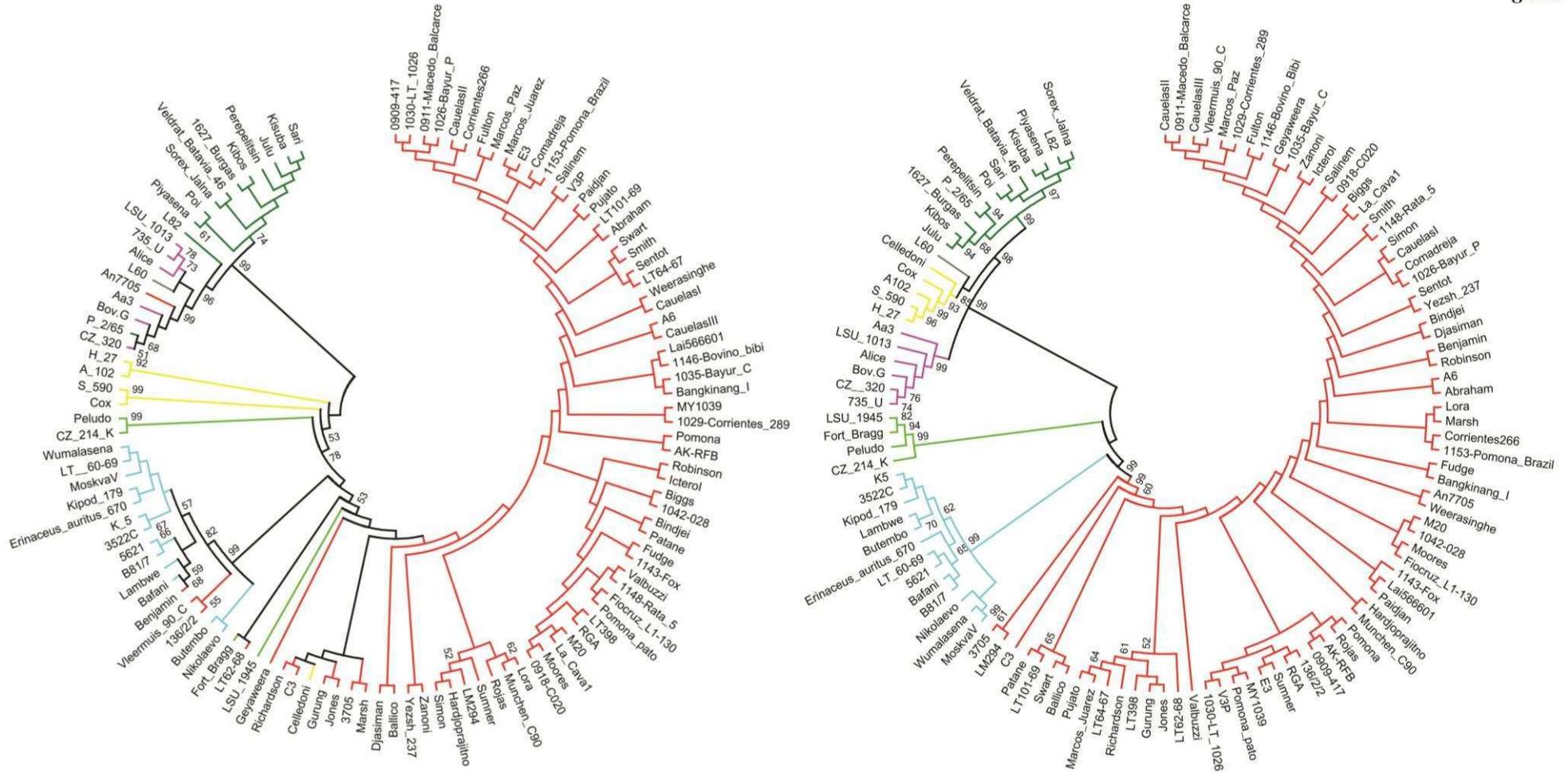


Figura 10. Dendrogramas obtenidos a partir las secuencias individuales de los loci correspondientes al esquema 7LA, utilizando 116 cepas. El aplicó el método de Máxima Verosimilitud, bajo el modelo de sustitución nucleotídica GTR/G+I (General Time Reversible model / *Gamma distributed with Invariant sites*), y 500 réplicas de *bootstrap*. Se indica en el margen derecho superior el locus correspondiente a cada dendrograma. Cada especie se indica de un color diferente: Rojo, *L. interrogans*; celeste, *L. kirschneri*; verde claro, *L. noguchii*; amarillo, *L. weilii*; rosa, *L. santarosai*; verde oscuro, *L. borgpetersenii*. a. Árboles correspondientes a los loci *adk* y *glmU* .

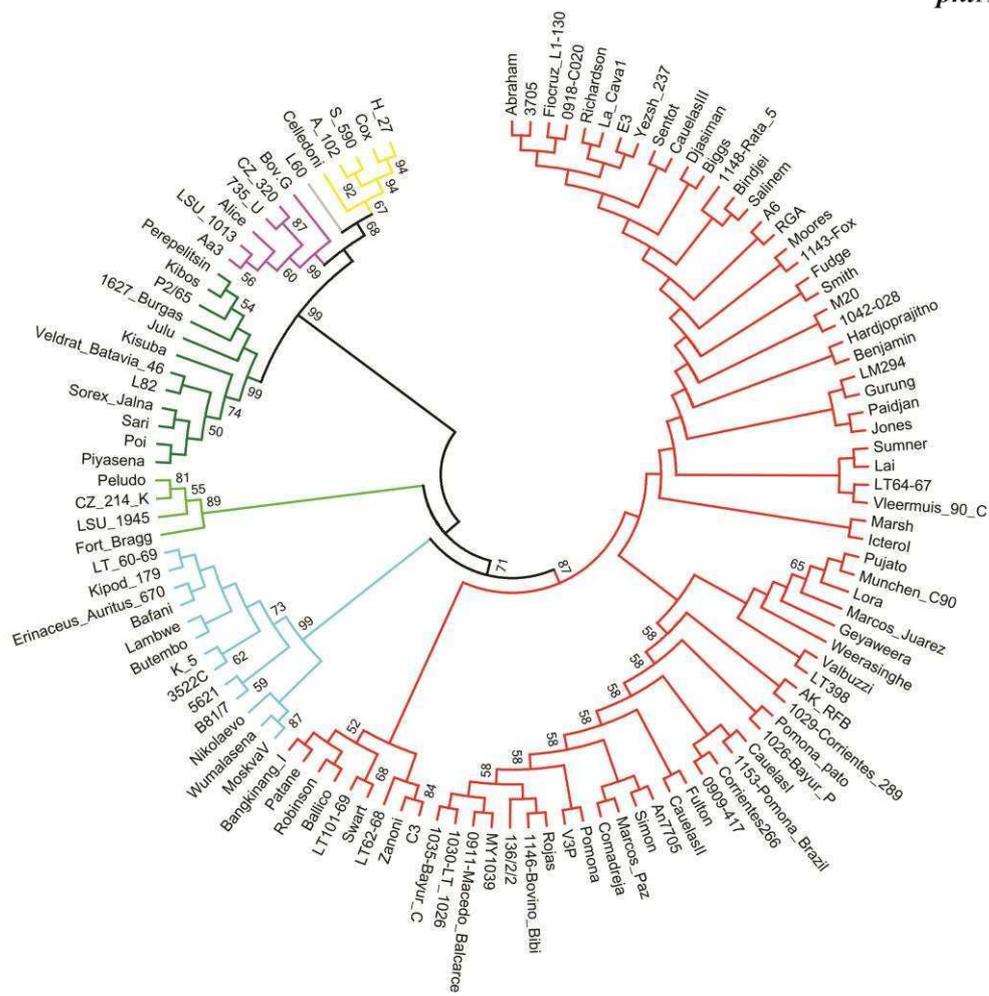


Figura 10. *d*. Árbol filogenético construido con las secuencias concatenadas del loci *pntA*.

6.5 Aplicación del perfil alélico para la inferencia del serogrupo

El Test de Microaglutinación en Placa (MAT, por sus siglas en inglés), permite la clasificación de las cepas de *Leptospira* spp. en serogrupos, pero éstos carecen de una correlación genética como ocurre en el caso del serovar. No obstante, la determinación del serovar no es frecuente, particularmente en Argentina, dado que requiere de métodos altamente específicos tales como el Test de Absorción y Aglutinación Cruzada (CAAT) o la electroforesis de campo pulsado (Kmetz y Dikken, 1993; Herrmann et al., 1992). Aunque el serovar posee importancia taxonómica éste no es un buen indicador de cercanía genética (Boonsilp et al., 2013). La situación más frecuente para los aislamientos argentinos es que se clasifiquen a nivel de serogrupo y no se cuente con la información del serovar. En base a este escenario exploramos la existencia de una correlación entre los STs y los serogrupos, que permitiera la inferencia de uno a través del otro. Para estudiar este aspecto se seleccionaron aquellos STs que estaban representados por más de una cepa, para así comparar los serogrupos de dichas cepas. Dado el alto poder discriminatorio logrado por el nuevo esquema de MLST y la gran heterogeneidad (geográfica, de hospedadores, serogrupos, etc.) entre las cepas analizadas, sólo 4 de 96 STs (ST3, ST47, ST52, ST16) describieron a 2 o más aislamientos. Estos STs a su vez constituyeron genotipos fundadores de complejos clonales que incluían principalmente aislamientos argentinos pertenecientes a la especie *L. interrogans*. Estas características los convirtieron en buenos candidatos para el análisis de MLST vs. serogrupo.

Bajo este enfoque se observó que los aislamientos descritos por el ST3, pertenecieron a los serogrupos Pomona (4/7) y Canicola (3/7). De igual modo el ST47 agrupó 7 aislamientos pertenecientes al serogrupo Icterohaemorrhagiae (Figura 8). Otros ocho aislamientos fueron tipificados con el ST52, en todos los casos de serogrupo Pomona, con excepción de un sólo aislamiento de serogrupo Sejroe. Además de los aislamientos argentinos, se encontraron 2 cepas pertenecientes al ST16 y de serogrupo Australis.

La búsqueda de correlación se realizó también en sentido inverso, partiendo de las cepas que compartían su clasificación de serogrupo e investigando si coincidían en su ST. El análisis en este sentido permitió incluir la totalidad de la colección de cepas debido a que cada serogrupo presentó dos o más cepas. Sin embargo no se encontró recurrencia de STs entre las cepas del mismo serogrupo, ya que se observaron dos o más STs diferentes dentro de cada conjunto. Esto imposibilitó la extrapolación de serogrupo a ST.

A partir de la relación estudiada para inferir un serogrupo a partir de un ST, se analizó la extensión de la misma a todos los STs que conforman un complejo clonal. Se encontró que no solamente el ST52 como genotipo fundador, sino también sus variantes de locus simple (SLVs) representaban aislamientos pertenecientes en su totalidad al serogrupo Pomona. Además, el ST47 y sus variantes de locus simple (SLVs) también coincidían en pertenecer al mismo serogrupo, Icterohaemorrhagiae. El ST3 y el ST55 aparecían conectados como SLVs en el análisis, y los aislamientos tipificados con estos perfiles estaban clasificados como Pomona o Canicola. Estos resultados apoyan la existencia de una relación subyacente entre el perfil alélico generado por MLST y el serogrupo en la colección de cepas analizadas, dado que las cepas asociadas a un ST (o a un conjunto de STs pertenecientes a un mismo complejo clonal) pertenecían a un mismo serogrupo, o a lo sumo a dos serogrupos diferentes.

6.6 Generación de base de datos disponible en internet para el esquema de MLST combinado (7LA): pubmlst.org/leptospira/

Las secuencias generadas a partir de nuevos aislamientos de *Leptospira* tipificados según el esquema 7LA en este estudio fueron depositadas inicialmente en la base de datos GenBank (Varni et al., 2014). No obstante, esta base de datos sólo permite la búsqueda y descarga de las secuencias depositadas, pero no provee herramientas que permitan contextualizar las mismas bajo los objetivos del MLST. Para utilizar esta información con un enfoque epidemiológico molecular, es necesaria la codificación de las secuencias en alelos y STs para cada cepa estudiada, con el objeto de que esta información pueda ser comparable entre entidades de investigación y diagnóstico alrededor del mundo.

Frente a esta necesidad se han desarrollado diferentes bases de datos (BD) específicas para MLST en las cuales se consideran datos propios de las secuencias (alelos y STs codificados) vinculados a datos de las cepas o aislamientos de origen, incluyendo en este punto información relevante para estudios epidemiológicos como procedencia geográfica, serotipificación, hospederos, datos temporales de ocurrencia del caso que dio origen al aislamiento, entre otros. Dichos datos dependerán de los parámetros epidemiológicos relevantes para cada microorganismo.

Hasta el momento, las BDs más relevantes por incluir la mayor cantidad de microorganismos tipificados corresponden a:

- *pubMLST*: incluye esquemas de MLST para 65 microorganismos (procariotas y eucariotas) y fue desarrollada hace más de una década por Keith Jolley y Martin Maiden en el Departamento de Zoología de la Universidad de Oxford en el Reino Unido (Jolley et al., 2004). Actualmente se accede a dicha BD través del enlace <http://pubmlst.org/>.
- *MLST.net*: incluye esquemas de MLST para 29 microorganismos (procariotas). El software original fue desarrollado por Man-Suen Chan (Universidad de Oxford) y la versión actual ha sido desarrollada por David Aanensen del Imperial College, Reino Unido (Chan et al., 2001). Actualmente se accede a dicha BD través del enlace <http://www.mlst.net/>.

Considerando que la evaluación del esquema combinado (7LA) resultó satisfactoria y permitió la optimización de los esquemas previos, se decidió implementarlo en una BD específica para MLST, posibilitando su disponibilidad para la comunidad científica. La elección de la BD se basó en que la plataforma *pubMLST* admite una mayor flexibilidad respecto de la incorporación de diferentes clases de marcadores moleculares y datos genómicos.

De esta manera se depositaron en la BD *pubMLST* las secuencias de los siete loci seleccionados (7LA), para las 116 cepas en las cuales se evaluó el esquema. El sitio funciona a partir de dos bases de datos vinculadas, una para la definición de secuencias, que contiene las secuencias depositadas de los alelos y los perfiles de MLST correspondientes, y otra para almacenar los datos de los aislamientos, incluyendo su procedencia y toda la información epidemiológica asociada. Consecuentemente es posible asignar los alelos de los loci individuales, generar un perfil alélico y determinar el ST correspondiente. También es posible acceder a la base de datos de cepas/aislamientos y realizar diferentes tipos de búsquedas, así como otros análisis tanto con las secuencias ya depositadas como con secuencias nuevas. El hallazgo de nuevas secuencias puede ser comunicado al curador de la BD de manera de enriquecer la misma a medida que nuevas cepas son tipificadas. La BD específica para *Leptospira* se accede a través del vínculo <http://pubmlst.org/leptospira/> (Figura 11).

.

PubMLST Databases Downloads BIGSdb Contact Site map

Leptospira spp. MLST Databases

This site uses two linked databases powered by the BIGSdb genomics platform. The sequence definition database contains allele sequence and MLST profile definitions whereas the isolate database contains provenance and epidemiological information. Further details about BIGSdb can be found in Jolley & Maiden 2010, *BMC Bioinformatics* **11**:595.

- Information
 - Primers used for amplification and sequencing
- Access main databases
 - Sequence/profile definitions database
 - Isolates database
- Policy document
- Submission of data
- BIGSdb software
- Recent publications using MLST in *Leptospira* research

This MLST scheme was developed by Paula Ruybal and colleagues at the University of Buenos Aires, Argentina. It is described in Varni *et al.* 2013, *Infect Genet Ecol* [Epub ahead of print].

Database curated by Paula Ruybal.

Figura 11. Captura de pantalla del sitio web *pubmlst.org/leptospira/* donde se depositaron las secuencias de 116 cepas correspondientes al esquema 7LA combinado que se obtuvo en este trabajo.

Resultados - Capítulo 3

MLST *in silico* a partir de genomas

6.7 MLST 7LA *in silico*

6.7.1. Inclusión del esquema 7LA en el Centro para la Epidemiología Genómica

Con el reciente auge de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), la secuenciación genómica de bacterias se ha incrementado notablemente, generando un volumen creciente de datos crudos de secuenciación. Dado que en la mayoría de los casos esta información tiene acceso público a través de internet, se han generado plataformas *online* para el análisis y aprovechamiento de estos datos desde diferentes enfoques. Uno de estos enfoques es el de la Epidemiología Genómica, que brinda diferentes herramientas para que a través del análisis de un genoma, sea posible estudiar factores genéticos y epidemiológicos asociados a una enfermedad o a un determinado patógeno. El Centro para la Epidemiología Genómica (*Center for Genomic Epidemiology*, <http://www.genomicepidemiology.org>) (Figura 12) es un sitio *web* que proporciona distintas aplicaciones *online* para el análisis de genomas en este área. El sitio está destinado a brindar al usuario la posibilidad de extraer información simplificada de los genomas a través de estas herramientas, permitiendo aprovechar las secuencias disponibles para sacar conclusiones epidemiológicas.

www.genomicepidemiology.org

Inicio sesión | PHSchool - The Biol... | SMARTHINKING.CO... | Phixr - Editor Online... | Bienvenidos a la Mo... | Danza Moriscā, exp

Center for Genomic Epidemiology

Home Organization Project Services Contact

Services

Phenotyping:

- Identification of acquired antibiotic resistance genes. [ResFinder](#)
- Prediction of a bacteria's pathogenicity towards human hosts. [PathogenFinder](#)
- Identification of acquired virulence genes. [VirulenceFinder](#)

Typing:

- Multi Locus Sequence Typing (MLST) from an assembled genome or from a set of reads. [MLST](#)
- PlasmidFinder identifies plasmids in total or partial sequenced isolates of bacteria. [PlasmidFinder](#)

Welcome to the Center for Genomic Epidemiology

Figura 12. Captura de pantalla del sitio web www.genomicepidemiology.org. Se indica con una flecha roja en la esquina inferior izquierda el vínculo para acceder a la aplicación de MLST genómico.

Entre las aplicaciones que se ofrecen se encuentra la denominada MLST 1.7 (Larsen et al., 2012), que permite determinar el perfil de MLST a partir de secuencias genómicas bacterianas (Figura 13). Esta aplicación requiere que el usuario cargue en el servidor el archivo que contiene la secuencia genómica, que puede presentarse como *short sequence reads*, o como secuencias preensambladas en formato .fasta. Se incluyen más de 60 especies diferentes de bacterias con sus esquemas de MLST correspondientes. La condición para poder evaluar datos genómicos según un esquema de MLST predeterminado es que el mismo forme parte de una BD en línea. En base a la especie seleccionada junto con el esquema de MLST (puede haber más de un esquema disponible por bacteria), la aplicación realiza una búsqueda en el genoma utilizando un método basado en BLAST para hallar los loci correspondientes al esquema y codificar los alelos. A partir de los mismos se asigna el *sequence type* (ST), permitiendo la tipificación del genoma correspondiente a la cepa secuenciada.

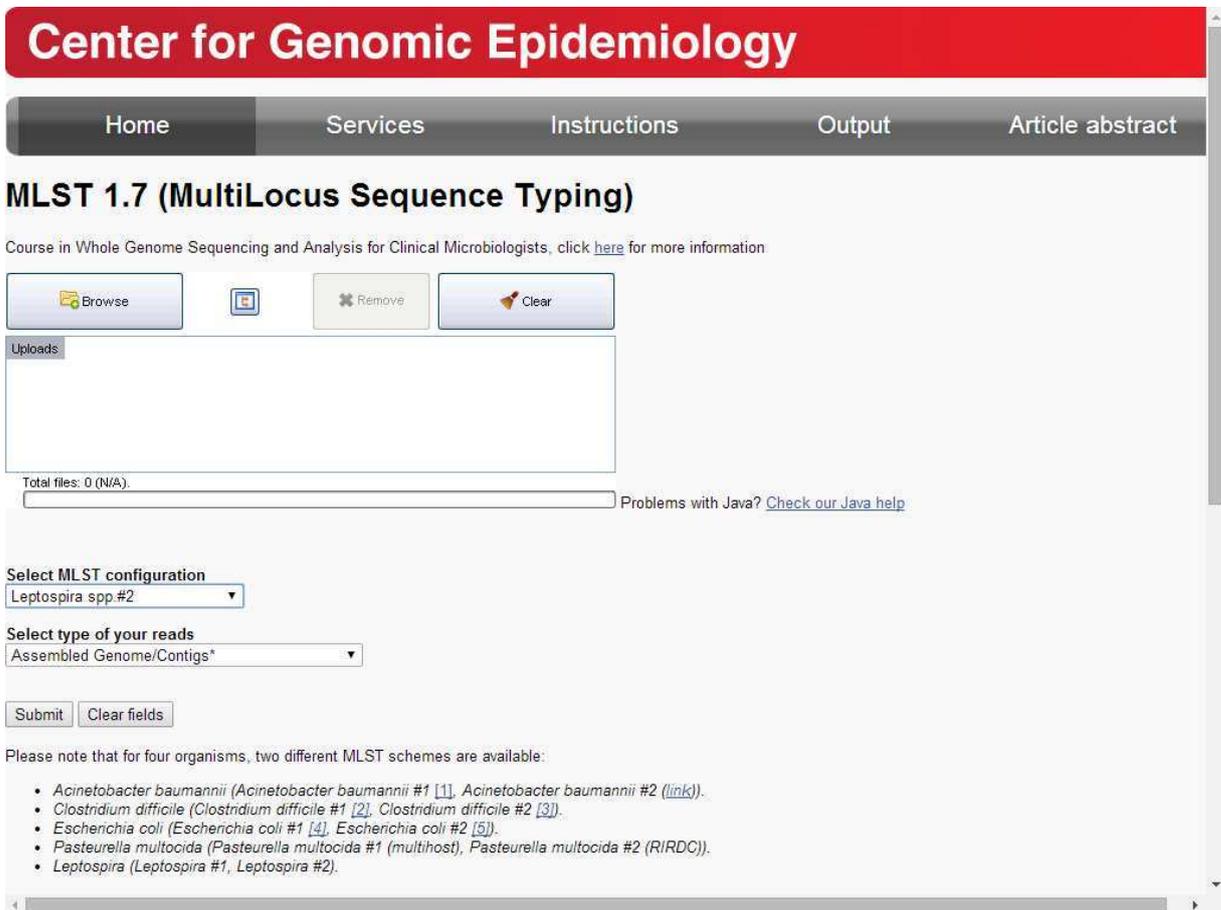


Figura 13. Captura de pantalla del sitio web <http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>. Se indica con una flecha roja el menú desplegable a través del cual se selecciona el esquema de MLST con el que se evaluará la secuencias genómica. En este caso se seleccionó el esquema *Leptospira* spp.#2 que corresponde a 7LA.

Al momento de incorporar el esquema 7LA para *Leptospira* spp. en el algoritmo MLST 1.7, el mismo ya contaba con la posibilidad de tipificación de esta bacteria mediante el esquema de MLST tailandés 7LT (Thaipadungpanit et al., 2007). De esta manera, los esquemas 7LT y 7LA fueron denominados como *Leptospira* spp.#1 y #2, respectivamente. Actualmente el esquema de MLST holandés (6LH) también se encuentra disponible como *Leptospira* spp.#3.

6.7.2. Tipificación de 300 cepas de *Leptospira* mediante MLST genómico

La incorporación del esquema 7LA en la aplicación MLST 1.7, permitió la tipificación *in silico* de cepas de *Leptospira* a partir de secuencias genómicas. Para ello se buscaron los genomas de *Leptospira* depositados en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=LEPTOSPIRA>). AL momento de este análisis (agosto de 2014) se encontraron 319 genomas, la mayoría generados en el marco del proyecto de secuenciación genómica del Instituto John Craig Venter (JCVI) denominado "*Leptospira*

Genomics and Human Health" (<http://gsc.jcvi.org/projects/gsc/leptospira/index.php>). Éstos incluían cepas de especies patógenas, especies de patogenicidad intermedia y saprófitas, y a su vez representantes de todos los serovares conocidos dentro de cada especie. Los resultados de mostraron siete genomas completos y 312 genomas "draft" (parcialmente ensamblados), con un número variable de *contigs* (fragmentos ensamblados). Se descargaron las secuencias genómicas para posteriormente tipificarlas utilizando el esquema optimizado 7LA ó "Leptospira spp. #2" de la aplicación MLST 1.7.

De este modo, se analizaron 288 cepas seleccionadas entre el total de los genomas (Tabla 3, Anexo), las que incluyeron 9 especies patógenas y 2 especies de patogenicidad intermedia (*L. licerasiae* y *L. fainei*), mientras que las especies saprófitas se excluyeron del análisis. Por lo tanto pudieron tipificarse dos nuevas especies patógenas (*L. alstonii* y *L. kmetyi*) que no habían sido analizadas anteriormente por MLST.

Si bien al desarrollar el esquema 7LA no se incluyeron especies intermedias, en esta etapa se exploró la tipificación de los genomas de las mismas. Las especies *L. licerasiae* y *L. fainei* contaban con cinco cepas disponibles en la base de datos (4 y 1 respectivamente). Al analizarse mediante MLST 1.7 las mismas presentaron coincidencia con las secuencias completas de los 7 loci; mientras que en el caso de otras especies intermedias disponibles (*L. broomi*, *L. wolfii* y *L. inadai*) no pudieron detectarse todos los loci, o bien se encontraron secuencias parciales en los genomas respectivos. Aunque este hallazgo indicaría que *L. licerasiae* y *L. fainei* efectivamente poseerían dichos genes en su genoma, presentaron mucha variabilidad de SNPs respecto de las especies patógenas. Por lo tanto, se decidió no asignar STs a las cepas de *L. licerasiae* y *L. fainei*, dando prioridad en este análisis a las especies patógenas.

Finalmente, la colección de genomas incluyó ocho cepas que ya habían sido tipificadas en este trabajo (sección 4.3) a partir del esquema 7LA. En la Tabla 12 se describe el número de cepas/genomas analizados por especie, y la representación de cada especie en la colección en términos porcentuales.

Tabla 12. Número de genomas por especie de *Leptospira* incluida en la tipificación *in silico*. Las especies indicadas con * no había sido tipificadas por MLST previamente. ND: no determinado.

Especie	Patogenicidad	Nro. de genomas	%
<i>L. interrogans</i>	Patógena	188	66,4
<i>L. kirschneri</i>	Patógena	25	8,8
<i>L. santarosai</i>	Patógena	24	8,5
<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	21	7,4
<i>L. noguchii</i>	Patógena	9	3,2
<i>L. weilii</i>	Patógena	8	2,8
<i>L. alstonii*</i>	Patógena	2	0,7
<i>L. kmetyi*</i>	Patógena	1	0,4
<i>L. alexanderi</i>	Patógena	1	0,4
L. sp. (especie no determinada)	ND	4	1,4

La aplicación de 7LA a la colección de 283 genomas produjo 107 STs. Sobre un total de 188 aislamientos pertenecientes a *Leptospira interrogans*, el 92,5% (99) de los mismos fueron descritos por el ST47, que definitivamente fue el genotipo predominante en el conjunto de genomas tipificados. Coincidentemente el ST47 también había sido uno de los STs mayoritarios en la colección de 116 cepas. Todos los aislamientos de ST47 con serogrupo determinado pertenecieron a Icterohaemorrhagiae, y la mayoría provino de hospedadores humanos (82/99), con excepción de 2 aislamientos obtenidos de un roedor y un canino. Si bien el 72 % de ellos tuvieron como origen geográfico a Brasil, este genotipo se encontró también en otros países latinoamericanos (Perú, Colombia y otros, 5 %), Estados Unidos (1 %) y países europeos (Francia, Dinamarca, Bélgica, 5 %). En el análisis previo (sección 4.3.2) ya se había descrito el ST47 en 7 aislamientos del mismo serogrupo (Icterohaemorrhagiae), 5 de ellos argentinos.

Otro de los genotipos mayoritarios para la especie *L. interrogans*, el ST52, agrupó siete cepas del serogrupo Pomona. Aunque en la colección precedente sólo los aislamientos argentinos presentaron este genotipo, en el conjunto de genomas el ST52 se encontró en cepas de diversas zonas geográficas como Egipto, Estados Unidos y Australia, en hospedadores humanos (4/7), animales salvajes (zorro) y mamíferos marinos (2). En Argentina, este ST fue hallado en aislamientos provenientes de ganado, es decir que las nuevas cepas aportaron información que permitiría relacionar aislamientos locales con los de otros orígenes geográficos, como así ampliar el rango de hospedadores, lo cual no se había revelado en la colección de 116 cepas. Asimismo, particularmente para estos dos genotipos de importancia local (ST47, Icterohaemorrhagiae y ST52, Pomona) se conservó la correlación entre ST y serogrupo.

Una observación significativa de este nuevo análisis respecto de algunas cepas de referencia tipificadas por segunda vez, ahora a través de su genoma, fue que presentaron un ST diferente. Este fue el caso de las cepas Fiocruz-LIC 130, M20, Moskva, Nikolaevo, Pomona, Swart y Valbuzzi, que son usadas en forma rutinaria en diversos laboratorios integrando el panel de pruebas serológicas.

6.7.2.1 Análisis de Asociación de STs - 7LA

Con el objetivo de estudiar las características epidemiológicas a nivel global a partir de la ampliación de la colección de cepas que permitió la tipificación *in silico*, se aplicó el algoritmo goeBURST a un total de 399 cepas, incluyendo 116 cepas de la colección previa junto con las secuencias genómicas. Seis cepas se encontraban en ambas colecciones.

El algoritmo goeBURST permitió establecer 64 *singletons* y 14 complejos clonales (CCs) asociando STs mediante variantes de 3 loci (TLVs) (Figura 14). Se pudo observar que seis de las especies patógenas más importantes estaban descritas dentro de estos CCs y que se hallaban confinadas en los mismos CCs, sin observarse coexistencia de diferentes especies dentro del mismo CCs, del mismo modo que lo ocurrido durante el desarrollo del esquema.

La especie mayoritaria *L. interrogans* se encuentra descrita en los CC0, CC5 y CC7 (Figura 14). El CC mayor (CC0) agrupó 75 de los 199 STs totales. Este CC contiene a los STs mayoritarios respecto del número de aislamientos que comprenden: ST 47 seguido por el ST52, ST3, ST118 y ST6.

De acuerdo a la distribución de hospedadores, el ST47 incluye 106 aislamientos provenientes de humanos, roedores, perros, zorro y muestras ambientales (Figura 14, b). Este ST está compuesto por cepas de distribución global, donde 87 de los 106 aislamientos (82%) provienen de humanos y entre ellos el 95% (83/87) pertenecen al serogrupo Icterohaemorrhagiae.

El ST52 contiene aislamientos de humanos, animales de producción (bovinos, porcinos), roedores y animales salvajes (zorros, mamíferos marinos), perteneciendo todos ellos al serogrupo Pomona. EL 53% de estos aislamientos provienen de Argentina, reforzando el resultado previo obtenido respecto de la importancia de este serogrupo en nuestro país (Caimi et al., 2012; Varni et al., 2013). Por otra parte si bien el ST6 agrupó tan sólo dos aislamientos, se encuentra asociado a otros 15 STs mediante 4 a 6 de los siete loci, convirtiéndose en el genotipo fundador del CC0. El ST3 agrupó 11 aislamientos provenientes de distintos hospedadores y serogrupos pero notablemente, todos ellos pertenecen al continente americano. EL ST118 contiene 6 aislamientos principalmente de roedores y el 5 de ellos (83%) pertenecen al serogrupo Pyrogenes.

Los otros dos CCs que describen a la especie *L. interrogans* son el CC5 y el CC7, agrupando 3 y 2 STs respectivamente. En el primer caso (CC5), si bien no se cuenta con la información precisa en todos los casos, la mayoría de los aislamientos en esos STs pertenecen al serovar Bataviae y en el segundo (CC7) todos los aislamientos pertenecen al serogrupo Gryppotyphosa y serovar Valbuzzi.

La especie *L. kirschneri* se encuentra circunscripta a los CC1, CC8 y CC9, siendo el CC1 el segundo en importancia respecto del número de STs que contiene (23 STs). El CC1 contiene tres STs mayoritarios, el ST134, ST137 y ST139. Los aislamientos incluidos en los ST134 y ST137 pertenecen a los serovares Gryppotyphosa y Valbuzzi respectivamente. Ambos serovares pertenecen al serogrupo Gryppotyphosa (nótese que los mismos también aparecen en la especie *L. interrogans*). La misma situación ocurre con el ST139, donde todos los aislamientos pertenecen al serovar Mosdok, serogrupo Pomona. El CC8 contiene aislamientos que pertenecen al serovar Bulgarica y si bien el CC9 contiene aislamientos con serología indeterminada todos ellos provienen de Tailandia.

Leptospira borgpetersenii esta circunscripta al CC2, CC10 y CC11 con 9, 2 y 2 STs respectivamente. El CC10 contiene STs que agruparon aislamientos pertenecientes solamente al serovar Hardjo-bovis. El CC11 incluye 2 STs que están presentes solamente en las islas francesas Mayotte, pero su serología es indeterminada.

Leptospira noguchii y *L. santarosai* fueron descritas por los CCs, CC12, CC13 y CC3 respectivamente y notablemente todos los aislamientos de ambas especies se encuentran solamente en el continente americano.

Leptospira weilli se agrupó en dos CCs distintos, CC4 y CC6, pero si bien todos los aislamientos provienen de humanos no se encontró relación aparente respecto de su serología.

La correlación observada previamente entre serología y perfiles alélicos se confirmó no solo a nivel de ST sino también a nivel de CCs, donde genotipos fundadores contenían aislamientos pertenecientes a uno o a dos serogrupos.

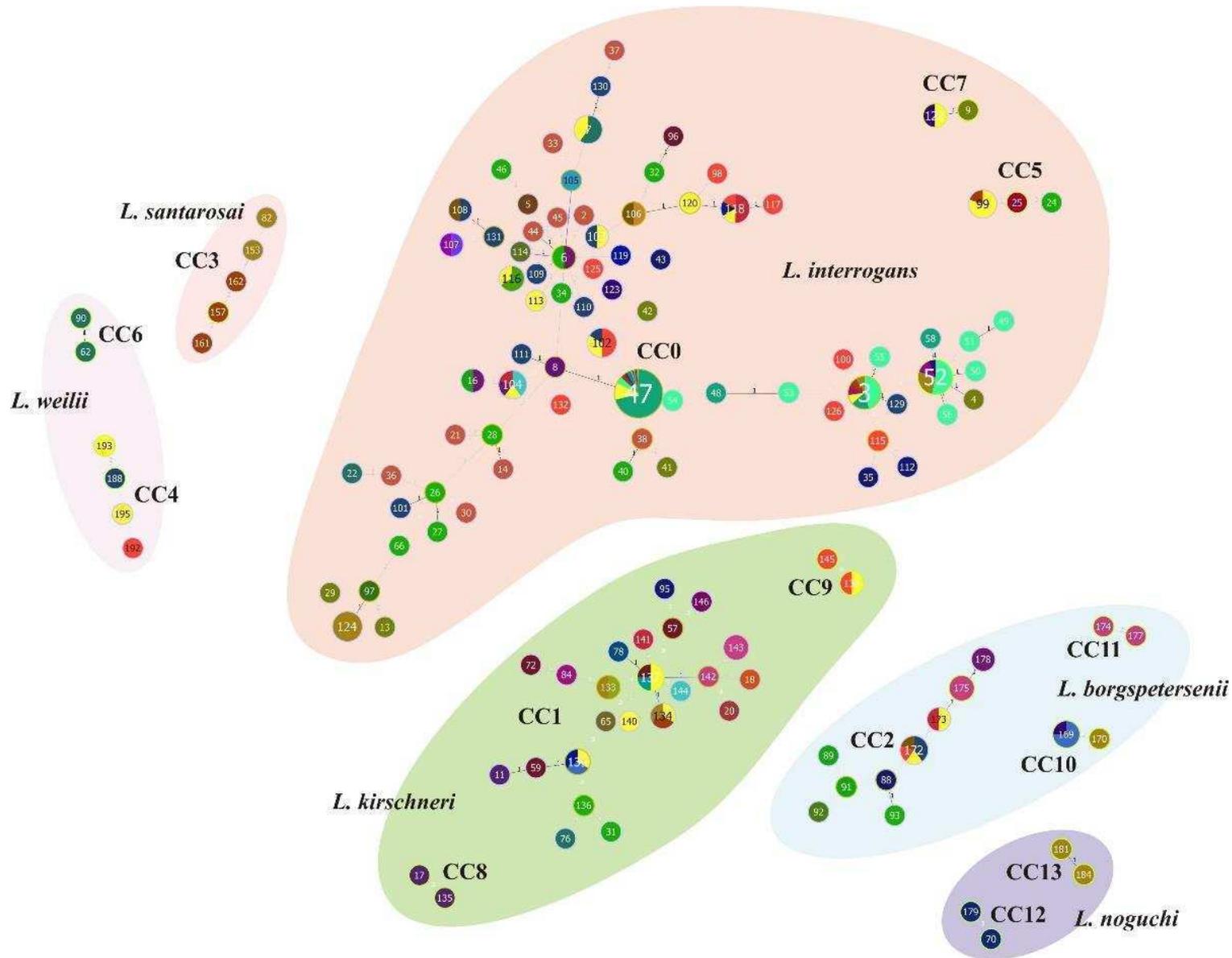


Figura 14.a. Asociaciones entre STs en 6 especies patógenas de *Leptospira* (7LA), coloreados según el país/es de origen. Se excluyeron los *singletons*. ST47: Argentina, verde claro; Brasil, verde oscuro; EEUU, marrón; Perú, bordó; Dinamarca, violeta oscuro; no determinado (NN), amarillo. ST52: Argentina, verde claro; Egipto, violeta; EEUU, marrón; Australia, azul. ST3: Argentina, verde claro; Brasil, verde oscuro; Perú, bordó; EEUU, marrón; Jamaica, lila; NN, amarillo. ST118: Tailandia, naranja; Sri Lanka, azul oscuro; Tanzania, marrón; NN, amarillo. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas incluidas.

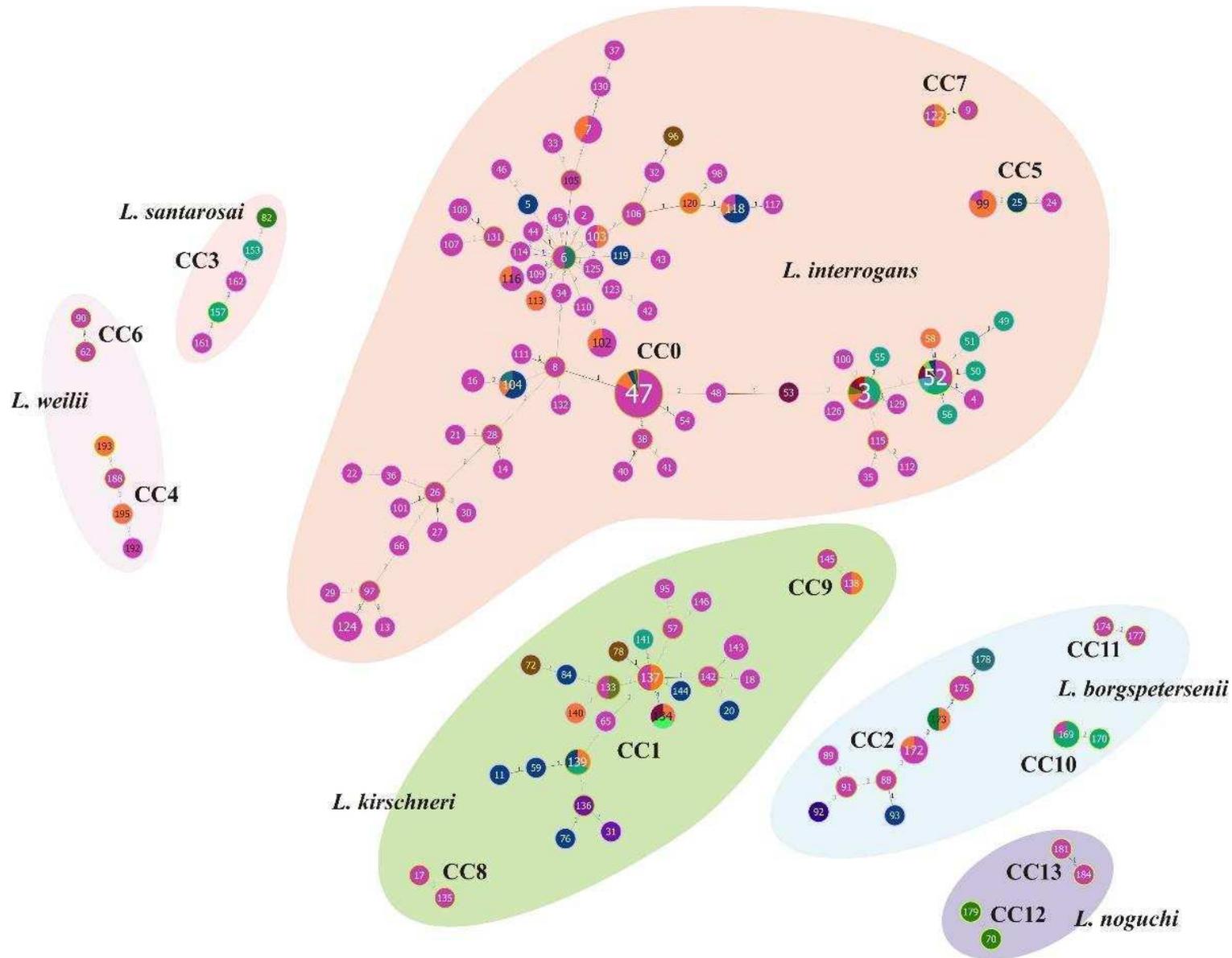


Figura 14.b. Asociaciones entre STs en 6 especies patógenas de *Leptospira* (7LA), coloreados según hospedador. ST47: humano, púrpura; perro, verde oscuro, ambiental, negro; zorro, verde claro; roedor, azul; no determinado (NN), naranja. ST52: bovino, verde; porcino, marrón; humano, púrpura; mamífero marino, celeste; zorro, verde claro; roedor, azul; NN, naranja. ST3: bovino, verde; humano, púrpura; comadreja, rojo; perro, verde oscuro; porcino, marrón. ST118: roedor, azul; humano, púrpura; NN, naranja. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas incluidas.

Resultados - Capítulo 4

Aplicación de MLST para tipificar muestras clínicas

6.8 MLST reducido para la aplicación en muestras clínicas

En general las muestras clínicas (sangre, orina, suero) provenientes de animales y humanos con leptospirosis son más abundantes y accesibles que los cultivos de la bacteria. Con la perspectiva de enriquecer las fuentes de información que permiten profundizar el conocimiento de los genotipos presentes en una región y facilitar así el seguimiento epidemiológico, se desarrolló una adaptación del esquema de tipificación para su aplicación en base a muestras clínicas. Considerando la dificultad en la obtención de buena cantidad y calidad de material genético a partir de estas muestras, se investigó una posible reducción del esquema 7LA al mínimo número de genes que permita la tipificación manteniendo el poder de discriminación alcanzado.

6.8.1. Selección de una combinación reducida de loci

La selección de loci se realizó a partir de las secuencias generadas durante el desarrollo del esquema 7LA, en la misma colección de 116 cepas (Tabla 1, Anexo). Partiendo de los 7 loci del esquema completo se realizó un nuevo cálculo de optimización (ídem sección 4.2) mediante el programa MLSTest (*Scheme optimization -> Test all combinations*). Se calculó el número de STs generados por distintas combinaciones de entre 1 y 7 loci (Figura 15). El punto de inflexión en cuanto al número de STs obtenidos respecto del número de loci incluidos se alcanzó con 3 loci, ya que al reducir más el esquema (1 ó 2 loci) disminuía considerablemente el número de STs generados (Figura 15). Entre 2 y 3 loci se produjo una variación de un máximo de 78 a 90 STs, mientras que para las combinaciones mayores a 3 loci el incremento en STs fue muy leve. El máximo de STs para 7 loci fue 96. Finalmente, el resultado más promisorio estuvo dado por la combinación de los loci *adk*, *LipL41* y *mreA*, a la que denominamos esquema de MLST reducido 3LA.

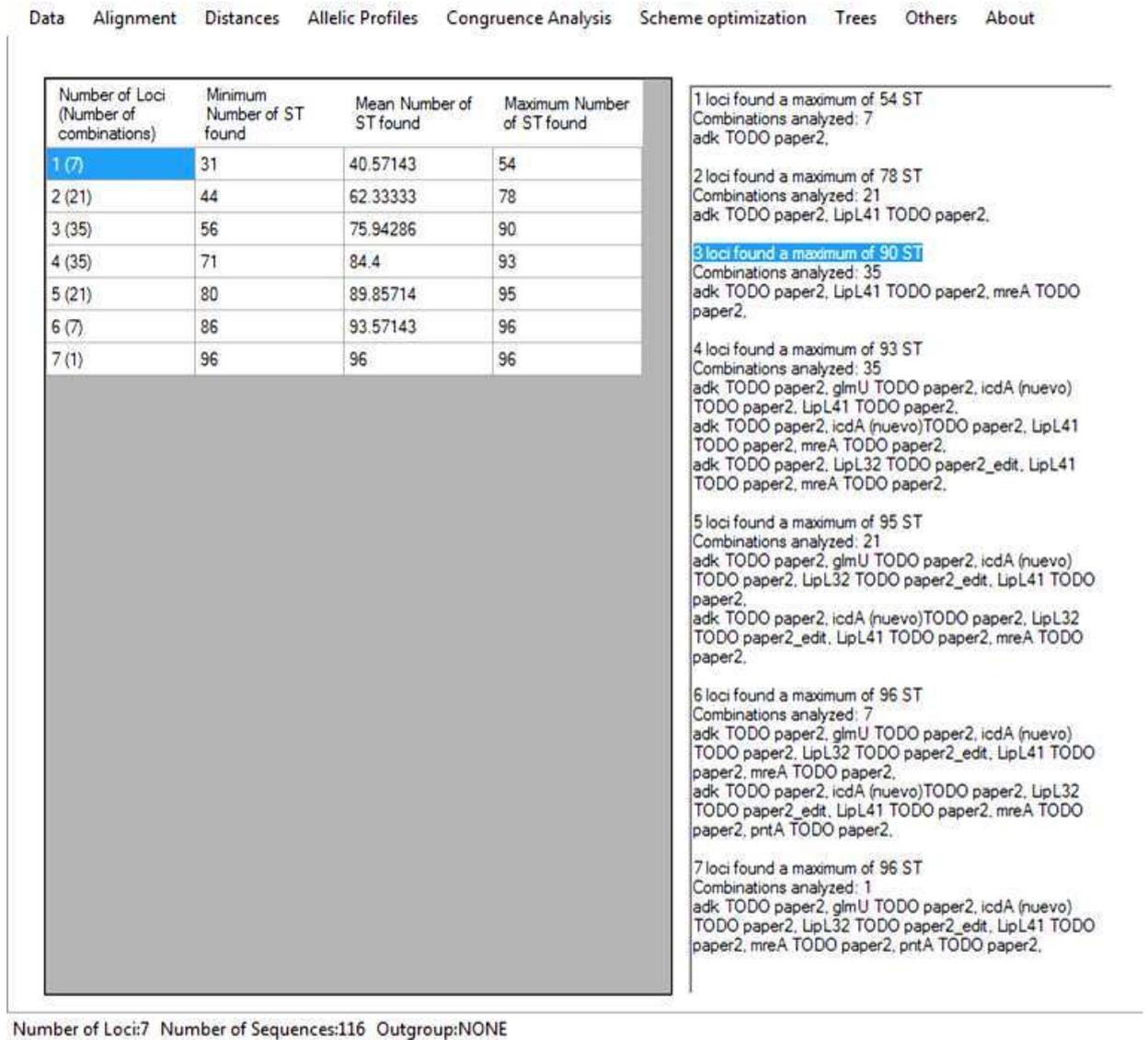


Figura 15. Captura de pantalla de resultados de la función *Scheme optimization* del software MLSTest, utilizando como *input* 7 loci (7LA) en formato .fasta. A la izquierda se presenta una tabla que indica el número de loci testeados con los correspondientes números máximos y mínimos de STs (dependientes de los loci incluidos en la combinación). El panel de la derecha muestra los loci involucrados en combinaciones entre 1 y 7, que arrojaron la cantidad máxima de STs. Se destaca en azul la combinación de 3 loci (*adk*, *lipL41* y *mreA*) que permitió tipificar 90 STs en una colección de 116 cepas.

6.8.2. Evaluación de 3LA

6.8.2.1. Determinación de STs

El primer paso de evaluación del esquema de MLST reducido fue el de obtener la tipificación (asignación de alelos y STs) de la colección ya conocida utilizando solamente los loci seleccionados para el esquema 3LA: *adk*, *LipL41* y *mreA*. Para ellos se aplicó la función *Allelic profiles* del programa MLSTest y como resultado se obtuvieron 90 STs específicos de este esquema. Es oportuno aclarar que si bien cada locus de los aquí incluidos presentarán el mismo

número de alelos que en la tipificación por 7LA, la numeración de los mismos (así como la de los STs finales) no necesariamente coincidirá entre los esquemas (por ejemplo, los STs de igual nombre no contendrán los mismos alelos) ya que la asignación tanto de alelos como de STs es dependiente del orden de las cepas al momento de su tipificación.

Con el objetivo de determinar si se mantenían las relaciones filogenéticas establecidas mediante el esquema completo (7LA), se concatenaron las secuencias de los 3 loci para las 116 cepas en el orden *adk* - *LipL41* – *mreA* y nuevamente se aplicó un análisis filogenético de ML. El árbol resultante separó correctamente a las especies en diferentes clusters, por lo tanto a partir de estos pasos confirmatorios se pasó a la aplicación del esquema 3LA en un conjunto de muestras clínicas.

6.8.3. Aplicación de 3LA en muestras clínicas

Dado que el esquema reducido fue satisfactorio en cuanto a su poder discriminatorio y consistente en las relaciones que permitió establecer entre los genotipos, se procedió a su aplicación en un conjunto de 61 muestras clínicas con diagnóstico positivo a leptospirosis por qPCR o MAT, pero de serogrupo desconocido *a priori* (Tabla 4, Anexo). La mayoría de las muestras a evaluar correspondieron a ADN extraído de suero (57); además se incluyeron una muestra de sangre entera y otras 3 muestras de suero, para las cuales la amplificación de ADN se realizó directamente del material de partida. Las 3 últimas fueron réplicas de muestras de ADN ya incluidas.

Como paso previo al MLST y para tener un conocimiento preliminar de las muestras, se realizó la amplificación del gen codificante para 16S ARNr en todas las muestras. Treinta y ocho muestras resultaron positivas a 16S ARNr, mientras que las 24 restantes no presentaron producto de amplificación. La distribución de especies entre las 38 muestras positivas fue la siguiente: 31 pertenecieron a *L. interrogans*, 1 a *L. borgpetersenii*, 1 a *L. kirschneri*, 2 a la especie saprófita *L. meyeri* y otras 2 no pudieron ser interpretadas por no haber logrado buena calidad en la secuenciación del fragmento amplificado.

Las 33 muestras de especies patógenas positivas a 16S ARNr se seleccionaron para la aplicación del esquema de MLST reducido. A partir de estas 33 muestras iniciales, 25 (74 %) fueron negativas en la amplificación para todos los loci, mientras que 9 muestras (26 %) fueron positivas para 1, 2 ó 3 loci. Sólo 4 (11.8 %) muestras, todas pertenecientes *L. interrogans*, pudieron ser amplificadas positivamente y secuenciadas correctamente para los 3 loci del

esquema. El algoritmo de trabajo junto con los resultados de cada etapa se esquematizan en la Figura 16.

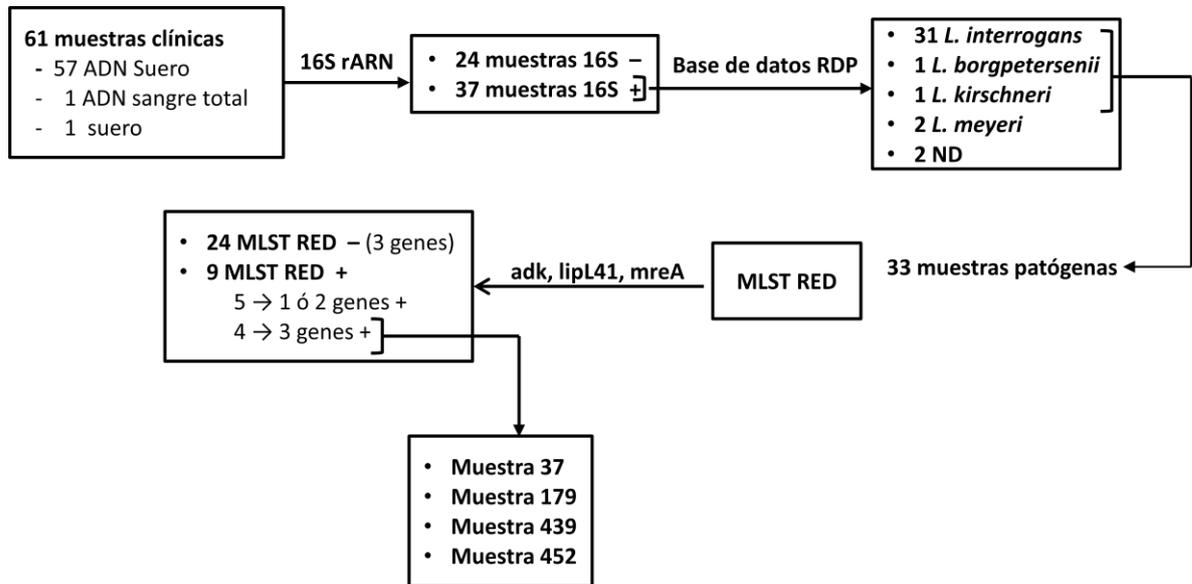


Figura 16. Algoritmo de trabajo utilizado para la determinación de especie y tipificación de las 61 muestras clínicas recibidas, incluyendo los resultados para cada etapa.

6.8.3.1 Relaciones clonales y filogenéticas

Por lo tanto las 4 muestras con la tipificación completa se incorporaron a la colección previa y se aplicaron los STs generados por el esquema de 3 loci (3LA) en un análisis de complejos clonales utilizando el criterio de SLVs. Se ingresó la tabla de tipificación incluyendo alelos, STs e información de serogrupos en el software PHYLOViZ y se aplicó el algoritmo goeBURST. Como es deseable para un esquema de MLST, se confirmó que a pesar de la reducción de loci, no había coexistencia de especies diferentes dentro de un mismo complejo clonal (Figura 17),

L. interrogans
L. kirschneri
L. borgpetersenii
L. weilii

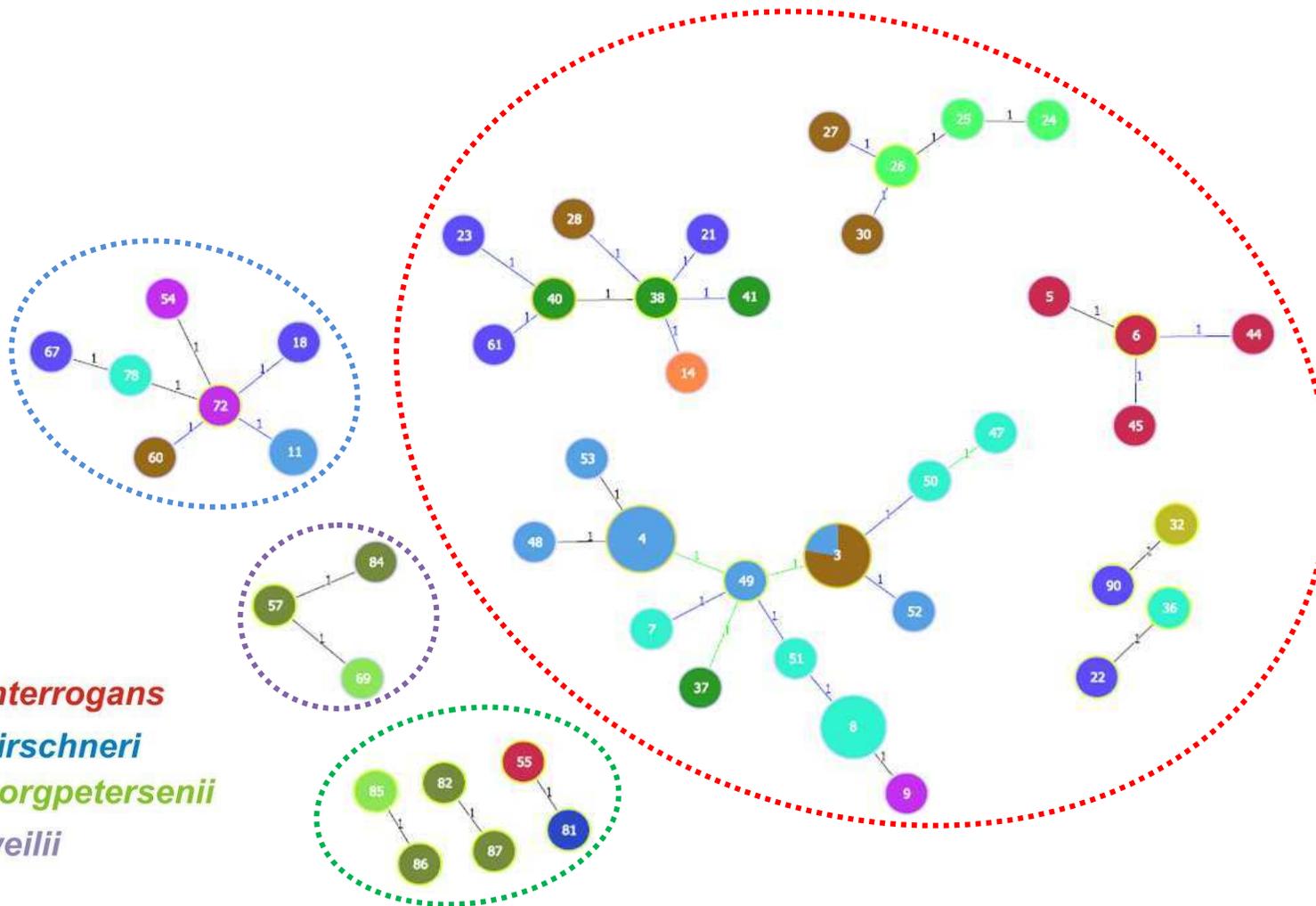


Figura 17. Asociaciones entre STs generados por el esquema 3LA, conectados por SLVs. Se excluyeron los *singletons*. Los contornos punteados agrupan complejos clonales formados por cepas de la misma especie de *Leptospira*. Los círculos son proporcionales al número de cepas para cada ST., mientras que los colores indican los serogrupos incluidos: marrón, Canicola (STs: 3, 27, 28, 30, 60); azul claro, Pomona (STs: 3, 52, 49, 4, 48, 53); celeste, Icterohaemorrhagiae (STs: 50, 47, 51, 8, 7, 36, 78); bordó, Sejroe (STs: 6, 5, 44, 45, 55); azul oscuro, Tarassovi (STs: 21, 23, 61, 90, 22, 67, 18, 81); verde flúo, Bataviae (STs: 24, 25, 26); verde oscuro, ; verde claro, Mini (STs: 85, 69); verde medio, Javanica (STs: 82, 86, 87, 57, 84); púrpura, Grippityphosa (STs: 9, 54, 72).

concluyendo que los STs relacionados pertenecen a la misma especie. Incluso en los casos donde un serogrupo apareció en cepas de diferentes especies, éstas presentaron distintos STs y de este modo pudieron discriminarse. Este fue el caso del serogrupo Pomona presente en cepas de las especies *L. interrogans* y también *L. kirschneri* (Figura 17, círculos azul claro) y también el serogrupo Sejroe, en *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* (Figura 17, círculos color bordó). Asimismo se conservó la correlación observada previamente entre STs y serogrupos en la mayoría de los casos, donde las cepas que comparten el ST pertenecen todas al mismo serogrupo. Sin embargo, la excepción estuvo dada nuevamente por los serogrupos Pomona y Canicola, que compartieron el ST3 y tampoco fueron diferenciables por el esquema completo (7LA).

Como segundo paso en la validación del esquema reducido se llevó a cabo un nuevo análisis filogenético (ML) utilizando las secuencias concatenadas de los 3 loci (*adk – lipL41 – mreA*), al igual que en los casos anteriores. En el árbol resultante, las muestras clínicas (Figura 18, puntos negros) fueron ubicadas correctamente dentro del cluster de la especie *L. interrogans*. Éstas se agruparon junto con aislamientos argentinos y algunas cepas de referencia en 2 de los clusters principales dentro de la especie, manteniéndose la consistencia respecto de los serogrupos. De acuerdo a este análisis se pudo asignar serogrupos probables a cada una de las muestras clínicas, a saber:

- muestra 37: se ubicó con cepas de serogrupo Icterohaemorrhagiae no habiendo otros serogrupos en el mismo cluster. Por lo tanto se asume que pertenecería a dicho serogrupo.
- muestras 452 y 179, incluidas en un *cluster* con mayoría de cepas Canicola (5/7) y 2 cepas Pomona (2/7).
- muestra 439, se vinculó a otras dos cepas, una de serogrupo Canicola y una cepa de serogrupo Sejroe, por lo tanto podría pertenecer a cualquiera de los dos serogrupos.

De aquí se desprende que del total de especies y serogrupos presentes en la colección, mediante el análisis filogenético en un contexto de cepas diverso se pudo:

1. conocer la especie de *Leptospira* presente en la muestra
2. deducir el serogrupo o bien restringir las posibilidades a lo sumo 2 serogrupos muy relacionados (Canicola/Pomona ó Canicola/Sejroe).

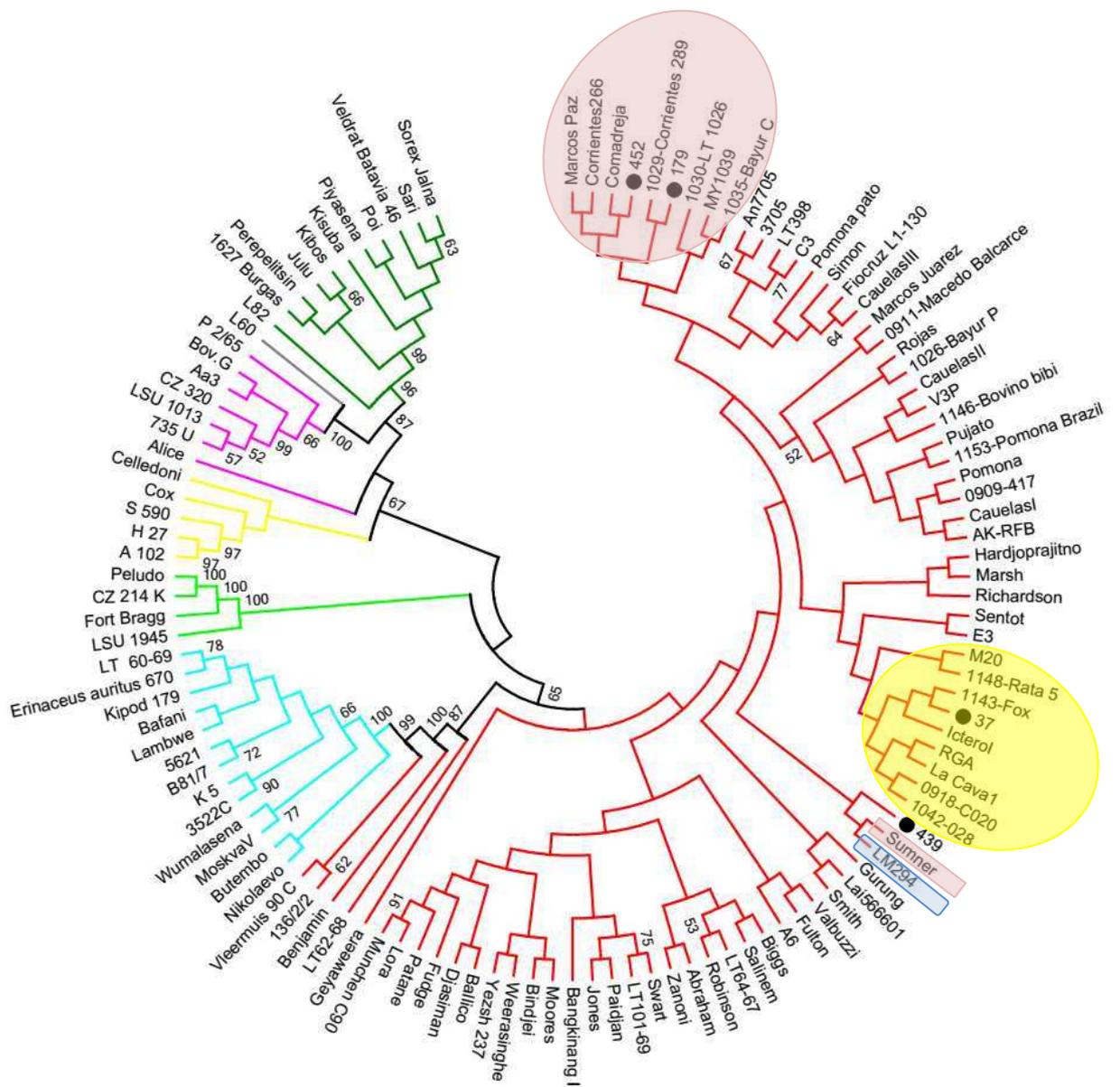


Figura 18. Árbol filogenético (ML) construido a partir de las secuencias concatenadas de los loci incluidos en el esquema 3LA. Se incluyeron las 4 muestras clínicas para las cuales se obtuvo amplificación positiva en todos los loci (452, 179, 37 y 439, indicadas con puntos negros). Los clusters coincidentes con serogrupos que incluyen a las muestras se sombrearon en colores: lila, Canicola/Pomona; amarillo, Icterohaemorrhagiae; azul, Sejroe.

6.8.4. Inferencia de serogrupo utilizando MLST reducido y base de datos <http://pubmlst.org/leptospira/>

Debido a que la aplicación del esquema de MLST reducido en muestras clínicas fue de utilidad tanto para la inferencia de especies como para restringir los serogrupos posibles de las muestras, se propone una alternativa para facilitar su implementación a través de la base de datos de MLST <http://pubmlst.org/leptospira/>.

Teniendo en cuenta que los 3 loci del esquema están presentes también en el esquema completo 7LA (disponible en esta base de datos), es posible determinar alelos para los mismos a través de las secuencias, en forma independiente. Las herramientas disponibles en la página permiten el ingreso de las secuencias de los loci por separado. Una vez conocidos los 3 alelos (en caso de que haya coincidencia), se puede acceder a la bases de datos de aislamientos, y hacer una búsqueda de cepas con los mismos alelos. De este modo podremos conocer los serogrupos correspondientes a dichas cepas, y así tener una aproximación para restringir la clasificación serológica de la especie de *Leptospira* presente en la muestra clínica.

Los pasos a seguir se describen a continuación.

1) Para ingresar las secuencias de los loci, se debe ingresar desde la página principal a la opción *Sequence/profile definitions database*.

PubMLST Databases Downloads BIGSdb Contact Site map

Leptospira spp. MLST Databases

This site uses two linked databases powered by the BIGSdb genomics platform. The sequence definition database contains allele sequence and MLST profile definitions whereas the isolate database contains provenance and epidemiological information. Further details about BIGSdb can be found in Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics **11**:595.

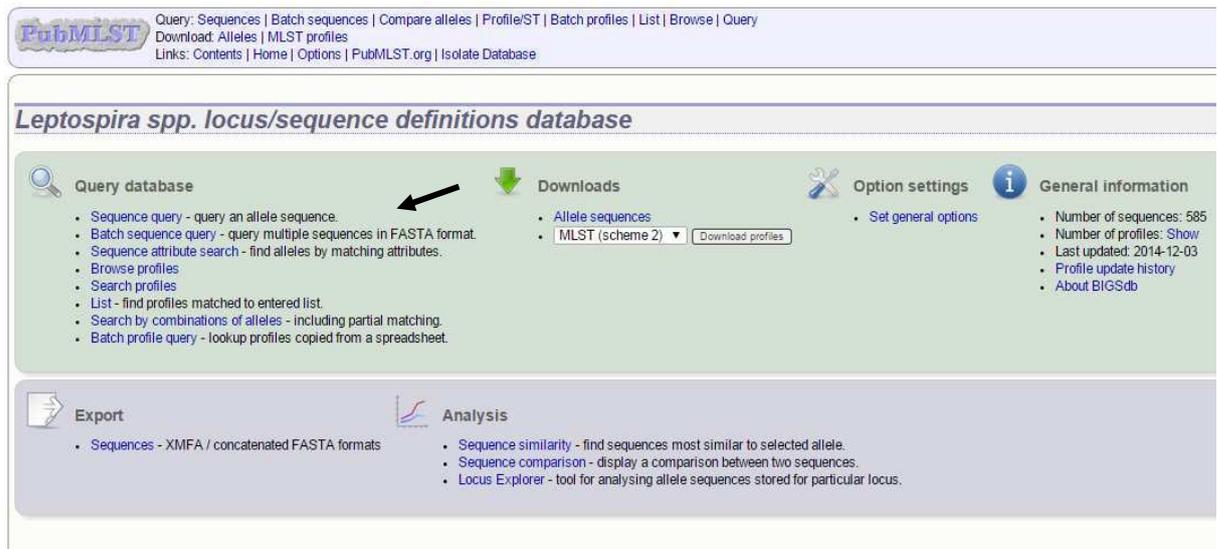
- Information
 - [Primers used for amplification and sequencing](#)
- Access main databases
 - [Sequence/profile definitions database](#) ←
 - [Isolates database](#)
- Policy document
- Submission of data
- BIGSdb software
- Recent publications using MLST in Leptospira research

This database hosts two Leptospira MLST schemes.

MLST scheme#2 was developed by Paula Ruybal and colleagues at the University of Buenos Aires, Argentina. It is described in Varni *et al.* 2014, *Infect Genet Ecol* **22**:216-22 and is curated by Paula Ruybal.

MLST scheme#3 was developed by Niyaz Ahmed and colleagues at the Pathogen Evolution Group, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, Hyderabad, India. It is described in Ahmed *et al.* 2006, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **23**:28 and is curated by Kishore Nalam.

2) Luego se selecciona la opción *Sequence query*



PubMLST Query: Sequences | Batch sequences | Compare alleles | Profile/ST | Batch profiles | List | Browse | Query
Download: Alleles | MLST profiles
Links: Contents | Home | Options | PubMLST.org | Isolate Database

Leptospira spp. locus/sequence definitions database

Query database

- Sequence query - query an allele sequence.
- Batch sequence query - query multiple sequences in FASTA format.
- Sequence attribute search - find alleles by matching attributes.
- Browse profiles
- Search profiles
- List - find profiles matched to entered list.
- Search by combinations of alleles - including partial matching.
- Batch profile query - lookup profiles copied from a spreadsheet.

Downloads

- Allele sequences
- MLST (scheme 2)

Option settings

- Set general options

General information

- Number of sequences: 585
- Number of profiles: Show
- Last updated: 2014-12-03
- Profile update history
- About BIGSdb

Export

- Sequences - XMFA / concatenated FASTA formats

Analysis

- Sequence similarity - find sequences most similar to selected allele.
- Sequence comparison - display a comparison between two sequences.
- Locus Explorer - tool for analysing allele sequences stored for particular locus.

y en la pantalla siguiente se elige el esquema de MLST que queremos utilizar para tipificar y se adjunta la/s secuencia/s en el espacio correspondiente (es importante destacar que en dicha base de datos el esquema 7LA se identifica como esquema #2, como así también los alelos de los genes respectivos se identifican con el superíndice 2 (ej. adk^2)). Es posible ingresar las secuencias de los 3 loci una debajo de la otra, en formato .fasta. También puede adjuntarse un archivo con este mismo formato. Como resultado se obtienen los genes y alelos de la base de datos que coincidieron con las secuencias ingresadas.



PubMLST Query: Sequences | Batch sequences | Compare alleles | Profile/ST | Batch profiles | List | Browse | Query
Download: Alleles | MLST profiles
Links: Contents | Home | Options | PubMLST.org | Isolate Database

Batch sequence query - Leptospira spp. locus/sequence definitions

Please paste in your sequences to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact can query using either DNA or peptide sequences.

Please select locus/scheme Order results by

Enter query sequences (FASTA format)

```
TTAATTGCGAGTATAGTGATGSTGGGAATTCGAATGCAAGAGGAAGTAAACATTAAGACAATAT
TATATACCTCTTGGAAATTTGGGAATCAGTTTGATTTCTGCTGTTGTAGTAATGAAAACCGTCCG
TTTCGAGAAAACCAAGTCATTCGATTCGACCGATTTTAAATCCGGAGGAATTTAAACAAGGTGCC
GGTTATCATCTGAGAGCTCTAAACCTGCGGTGGATCGGGAAGATTTTCGGAAAAGGSCGTGATG
AATGCGAATAATGACCGAAGGAAGAATTCACACGTACCGAAGATCCAGCACTGATTTTATTTTGGCT
TCCTGGCGGAAACCAACCGGGTTTTTAGGATCTGTATTT
```

Alternatively upload FASTA file

Select FASTA file:

Action

Sequence	Results
75BV	Exact match found: adk^2 : 3
75BV	Exact match found: $lipL41^2$: 3
75BV	Exact match found: $mreA^2$: 1

Text format

De esta forma, una vez obtenida la numeración de los alelos, podemos pasar al siguiente paso y buscar aquellas cepas que tengan los mismos alelos en los loci.

4) Para ello se regresa a la primera pantalla y luego se ingresa en la base de datos de aislamientos (*Isolates database*).

PubMLST Databases Downloads BIGSdb Contact Site map

Leptospira spp. MLST Databases

This site uses two linked databases powered by the **BIGSdb** genomics platform. The sequence definition database contains allele sequence and MLST profile definitions whereas the isolate database contains provenance and epidemiological information. Further details about BIGSdb can be found in Jolley & Maiden 2010, *BMC Bioinformatics* **11**:595.

- Information
 - Primers used for amplification and sequencing
- Access main databases
 - [Sequence/profile definitions database](#)
 - Isolates database
- Policy document
- Submission of data
- BIGSdb software
- Recent publications using MLST in *Leptospira* research

This database hosts two *Leptospira* MLST schemes.

MLST scheme#2 was developed by Paula Ruybal and colleagues at the University of Buenos Aires, Argentina. It is described in Varni *et al.* 2014, *Infect Genet Ecol* **22**:216-22 and is curated by Paula Ruybal.

MLST scheme#3 was developed by Niyaz Ahmed and colleagues at the Pathogen Evolution Group, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, Hyderabad, India. It is described in Ahmed *et al.* 2006, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **23**:28 and is curated by Kishore Nalam.

5) Una vez allí, se selecciona la opción *Search by combinations of loci (profiles)* que está bajo el menú *Query database*.

PubMLST Query: Search | Browse | List
Breakdown: Isolate fields | Scheme/alleles | Publications
Links: Contents | Home | Options | Profiles/sequences definitions

Leptospira isolates database

The *Leptospira* spp. PubMLST database contains data for a collection of isolates that represent the total known diversity of *Leptospira*. For every allelic profile in the profiles/sequence definition database there is at least one corresponding isolate may be submitted to this database and consequently it should be noted that it does not represent a population sample.

- Query database**
 - Search database - advanced queries.
 - Browse database - peruse all records.
 - Search by combinations of loci (profiles) - including partial matching.
 - List query - find isolates by matching a field to an entered list.
- Option settings**
 - Set general options - including isolate table field handling.
 - Set display and query options for locus, schemes or scheme fields.
- General information**
 - Isolates: 214
 - Last updated: 2014-12-08
 - Update history
 - About BIGSdb
- Breakdown**
 - Single field
 - Two field
 - Polymorphic sites
 - Unique combinations
 - Scheme and alleles
 - Publications
- Export**
 - Export dataset
 - Sequences - XMF / concatenated FASTA formats
- Analysis**
 - Presence/absence status of loci
- Miscellaneous**
 - Description of database fields

6) En la siguiente pantalla, simplemente ingresamos los alelos numéricos obtenidos previamente para los 3 loci, en los campos correspondientes. Luego cliqueamos en *Submit* y obtendremos como resultado aquellas cepas que comparten alelos en esos 3 loci en particular.

PubMLST Query: Search | Browse | List
 Breakdown: Isolate fields | Scheme/alleles | Publications
 Links: Contents | Home | Options | Profiles/sequences definitions

Search *Leptospira* isolates database by combinations of loci

Schemes
 Please select the scheme you would like to query:
 MLST (scheme 2)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile by searching remote database
 adk² glmU² icdA² lipL32² lipL41² mreA² pntA² ST:
 1 1 1 1 1

Filters: Include old record versions
 Options: Search:
 Display/sort options: Order by: ascending
 Display: records per page

Exact matches found (3 loci).
 1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

id	isolate	aliases	country	year	Isolate fields				species	serovar	serogroup	MLST (scheme 2)						MLST (scheme 3)				
					coinfections	disease	host	source				adk ²	glmU ²	icdA ²	lipL32 ²	lipL41 ²	mreA ²	pntA ²	ST	adk ³	icdA ³	lipL32 ³
87	136/22		Kuwait					<i>Leptospira kirschneri</i>	Kuwait	Canicola	1	1	1	1	1	1	1	14	23	12	19	12

Analysis tools:
 Breakdown:
 Analysis:
 Export:

La base de datos de aislamientos incluye la información de serogrupo y serovar (cuando esta es conocida), así como el origen geográfico y el hospedador. De este modo podremos saber cuáles son las similitudes con otras cepas, y tener una orientación acerca de los posibles serogrupos a los que puede corresponder la muestra. En caso de obtener una lista de cepas con diferentes serogrupos, es conveniente filtrar las mismas por región geográfica, pues al tener en cuenta este factor tendremos una mejor aproximación a la epidemiología local.

Discusión

7. Discusión

La identificación y caracterización de cepas es un requisito esencial para poder llevar adelante el estudio epidemiológico de un microorganismo patógeno, ya que se requiere del conocimiento de la diversidad a nivel interespecífico e intraespecífico para poder establecer relaciones entre diferentes aislamientos. Persiguiendo este objetivo, la epidemiología molecular brinda herramientas para identificar, caracterizar y rastrear entidades biológicas de un patógeno (ej. especies, subespecies, cepas, clones), valiéndose de la tecnología molecular y el conocimiento en biología evolutiva. Los conocimientos así generados permiten evaluar el impacto de la diversidad genética del patógeno en sus propiedades epidemiológicas relevantes (Tibayrenc, 2009). A su vez, el estudio epidemiológico puede enfocarse en forma local o a corto plazo, o en forma global o a largo plazo para responder diferentes preguntas. En el primer enfoque se busca la respuesta a cuestiones relacionadas a brotes, fracasos terapéuticos o la aparición de cepas con mayor grado de virulencia de un organismo en una localidad. En el segundo enfoque, la finalidad es establecer relaciones entre distintas líneas clonales que se manifiestan en distintos países/continentes a lo largo del tiempo, produciendo brotes o bien estableciéndose en forma endémica. Este nivel de la epidemiología debe ser capaz de trazar la dispersión de líneas clonales geográfica y temporalmente, distinguiendo las diferentes variedades que van surgiendo en el proceso de dispersión (Vázquez y Berrón, 2004).

Tradicionalmente, el conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis fue construido a partir de estudios serológicos. La caracterización serológica a nivel de serovar se realizó y aún se realiza mediante la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) (Kmety y Dikken, 1993). Mediante ésta técnica, dos cepas se consideran diferentes si, después de la absorción cruzada con cantidades adecuadas de antígenos heterólogos, al menos 10% del título heterólogo permanece asociado con uno de los dos antisueros regularmente. La técnica CAAT demostró ser de utilidad en la clasificación de *Leptospira*, determinándose más de 250 serovares, reconociéndose en los de mayor prevalencia, una estrecha relación con determinada especie de hospedador (Faine et al., 1999). Los serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos. Al día de hoy se reconocen alrededor de 24 serogrupos asociados a especies patógenas (Cerqueira et al., 2009).

Para el diagnóstico de los casos humanos y animales, así como en el estudio de los reservorios, la metodología de referencia para la identificación del serogrupo infectante es la prueba de aglutinación microscópica (MAT). Aunque es una técnica ampliamente establecida para la clasificación de cepas, la misma demostró tener un bajo valor predictivo a nivel de la muestra individual, debido a reacciones cruzadas y a discrepancias la determinación de serogrupos (Levett, 2003). Asimismo una de las desventajas de MAT es la imposibilidad de determinar a qué especie pertenece la muestra problema, dado que existen serovariedades presentes en más de una especie, en algunos casos tanto en especies patógenas como saprófitas. No obstante, el MAT aún posee utilidad epidemiológica a nivel poblacional, ya que puede brindar una idea estimativa de los serogrupos más comunes en una determinada población.

Durante las últimas décadas los métodos de tipificación molecular han cobrado gran importancia en la caracterización de patógenos, así como en el conocimiento de la estructura poblacional y de la diversidad genética. En este área se han desarrollado diferentes estrategias que permiten la diferenciación y la clasificación de las cepas de *Leptospira*. Teniendo en cuenta que dentro del género se describieron 9 especies patógenas (7 de ellas principales por ser las más aisladas) (Lehman et al., 2014), es necesario que las metodologías de tipificación sean capaces de distinguir aislamientos no solo a nivel intraespecífico, sino también a nivel interespecífico. Por ello, los distintos métodos deben evaluarse sobre todas las especies patógenas.

Hasta el momento de inicio de esta tesis doctoral, la tipificación molecular de *Leptospira* constituía una herramienta de muy escaso desarrollo en nuestro país. La técnica mayormente utilizada ha sido el Análisis de VNTRs Multilocus o MLVA en conjuntos reducidos de aislamientos y cepas de referencia (Paván et al., 2008; Paván et al., 2011), incluyendo solamente a las especies *L. interrogans* y *L. kirschneri*. Como se discute a lo largo de este trabajo, los métodos tradicionales para la caracterización de cepas de *Leptospira* son fundamentalmente de tipo serológico, y si bien constituyen las técnicas de referencia utilizadas tanto en laboratorios de diagnóstico como de investigación, presentan distinto grado de precisión, e incluso como ya se mencionó, no permiten conocer las distintas especies patógenas circulantes. En tal sentido, el estudio de la diversidad poblacional a nivel genético constituye un enfoque fundamental que permitiría relacionar los genotipos predominantes con otros factores de interés epidemiológico, tales como la

transmisibilidad de los mismos, la asociación a hospedadores, distribución geográfica, serología, etc.

A partir de las dificultades descritas para la obtención de información fehaciente para la epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis, esta tesis tuvo como principales objetivos la evaluación y el desarrollo de diversos métodos de tipificación molecular basados en amplificación por PCR que permitan conocer el contexto genético de este patógeno en Argentina. Para ello se planteó la caracterización de aislamientos argentinos provenientes de distintos hospedadores y regiones, resultando de suma importancia poder establecer los diferentes niveles de clasificación de las cepas y aislamientos estudiados. En tal sentido se desarrolló un algoritmo de análisis que utilizó el serogrupo como dato de partida, seguido de diferentes estrategias de tipificación molecular de acuerdo a niveles crecientes de poder discriminatorio.

Como fuera mencionado anteriormente, la serotipificación de los aislamientos es la técnica aplicada por los laboratorios de referencia de nuestro país. En este contexto y a fin de cumplimentar el objetivo de caracterización genética de dichos aislamientos fue necesario establecer como punto de partida la determinación taxonómica de los mismos a nivel de especie, a partir de la secuenciación y análisis del gen ribosomal 16S.

Como primer punto se identificó a *L. interrogans* como la especie mayoritaria a las que pertenecían las muestras estudiadas, tanto a nivel de aislamientos, como de muestras clínicas. Como se describió en la introducción de este trabajo las distintas especies patógenas componentes de este género poseen características genéticas diferentes e incluso algunas de ellas como *L. borgpetersenii*, han perdido su capacidad de crecimiento en el medio ambiente fuera del hospedador debido a un proceso de decaimiento genético que no ha sufrido *L. interrogans* (Bulach et al., 2006). Estas características generan asimismo, una diferencia en la capacidad de crecimiento *in vitro* de dichas especies, requiriendo en algunos casos la adición de otras fuentes de carbono como por ejemplo piruvato que no se encuentran disponibles en los medios de cultivo tradicionalmente utilizados (EMJH, Fletcher, etc.) (Levett, 2001). El aislamiento de *Leptospira* se encuentra restringido a pocos laboratorios de nuestro país que utilizan los medios de cultivo mencionados. Esta práctica podría generar un sesgo en la capacidad de aislamiento de otras especies además de la mayormente identificada: *L. interrogans*.

Como segundo paso y eje principal de este trabajo, se aplicaron dos métodos de tipificación molecular entre los cuales, resultó el más promisorio la tipificación por secuenciación de múltiples loci o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Maiden et al., 1998). Esta estrategia se ha convertido en una técnica líder, debido a su alto poder discriminatorio entre distintos aislamientos bacterianos, su fácil aplicación y estandarización, además de brindar la posibilidad de transmitir la información obtenida en distintos laboratorios a través de bases de datos públicas. El método permite generar gran cantidad de datos basados en secuenciación de manera certera y aplicable a estudios poblacionales y epidemiológicos (Maiden et al., 2006). Las diferentes colecciones de cepas analizadas en esta tesis fueron ampliándose en función de la disponibilidad de nuevos aislamientos y cepas, cuyas secuencias fueron publicadas durante el transcurso del trabajo. Fue así que inicialmente se contó con una colección reducida de aislamientos argentinos (18) y cepas de referencia de otras zonas geográficas (7). En esa instancia, se disponía de tres posibles esquemas de MLST que habían sido diseñados para tipificar *Leptospira*, pero sólo dos de ellos habían sido validados en conjuntos mayores de cepas (Thaipadungpanit et al., 2007; Ahmed et al., 2006), aquí denominados 6LH y 7LT. Los dos esquemas estaban compuestos por distintos conjuntos de genes. El diseño 7LT se basó en una estrategia convencional cuyos siete loci eran fragmentos de genes constitutivos o *housekeeping*. El objetivo de este diseño fue el análisis de los aislamientos obtenidos a partir de un brote epidemiológico en Tailandia, en un período de tiempo acotado, sin profundizar en la elección de loci. Mientras que el diseño 6LH se diferenciaba por incluir loci no constitutivos. Este es el caso de los loci *lipL32* y *lipL41*, que codifican para proteínas de membrana, los cuales podrían estar sujetos a selección positiva por ser posibles blancos del sistema inmune. En ningún caso se evaluaron parámetros referidos a los loci, como por ejemplo el tipo de selección al que estarían sometidos. En cuanto a su implementación, únicamente el esquema 7LT tenía asociada una base de datos en plataforma *web* poniendo a disponibilidad pública las secuencias generadas a partir de su aplicación. Estos dos diseños de MLST fueron comparados en un estudio (Ahmed et al., 2011), donde se concluyó que cada uno de ellos contenía loci con diferente capacidad discriminatoria y asimismo se remarcó que los diseños permitían caracterizar sólo dos especies patógenas, *L. interrogans* y *L. kirschneri*.

En esta tesis, el conjunto inicial de aislamientos se tipificó *de novo* utilizando el esquema 7LT debido a que como se mencionó, poseía una base de datos asociada que permitió la comparación de las secuencias aquí generadas con otras a nivel mundial. Este esquema consta del análisis de

siete genes de los cuales seis se encuentran distribuidos en el cromosoma I y el restante en el cromosoma II. Este último, el gen correspondiente a la enzima ligasa de ácidos grasos de cadenas largas (*Putative long-chain-fatty acid-CoA ligase*) o *fadD* presentó baja eficiencia de amplificación. De esta manera, este locus impedía obtener el esquema 7LT completo de loci dificultando el análisis de las cepas. El cromosoma II de *Leptospira interrogans*, especie a partir de la cual se generó este esquema, posee un tamaño de 360 kb (Ren et al., 2003). Por este motivo y tendiente a incrementar la eficiencia de amplificación de este gen se diseñaron nuevos *primers* externos a los propuestos por los autores del trabajo original, consiguiendo así la amplificación deseada e incrementando en un factor de 25 dicha eficiencia (Caimi et al., 2012).

En forma generalizada se suele describir a *Leptospira* como un género homogéneo en términos genéticos, especialmente si se la compara con otras bacterias que sufren altos niveles de recombinación genética (por ejemplo *Escherichia coli*) (Feil y Spratt, 2001). A pesar de ello, en los últimos años se han encontrado evidencias de recombinación genética en el género, entre ellas el origen filogenético del antígeno O (componente del LPS) en la especie de patogenicidad intermedia *L. licerasiae* que podría haber sido incorporado mediante transferencia horizontal (Ricaldi et al., 2012). Asimismo, en la colección analizada se observó que los loci eran poco variables en cuanto a su número de alelos y polimorfismos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs). A pesar de ello, se hallaron tres nuevos STs que no estaban descritos previamente en la base de datos correspondiente al esquema 7LT. Se observó que dos de ellos derivaron de la aparición de nuevos alelos en dos de los loci (STN1, *pfkB* y STN3, *glmU*) mientras que otro, el STN2, consistió en una combinación diferente entre alelos ya conocidos, de los STs 17 y 58. En el caso del STN3, se observó que el alelo nuevo perteneciente al loci *glmU* presentaba un número elevado de sustituciones nucleotídicas (77) respecto de los otros alelos del mismo loci, que entre todos sumaban sólo cuatro posiciones polimórficas. Aunque la colección de cepas analizada es reducida para delinear una conclusión definitiva, la aparición de un número elevado de polimorfismos en un alelo podría considerarse como uno de los casos clásicos que evidencian la existencia de recombinación en una población de bacterias. Dado que dicha hipótesis explicaría con mayor probabilidad la aparición simultánea de numerosos cambios nucleotídicos, frente a la posibilidad de fijación de polimorfismos generados por mutaciones puntuales al azar (Pavón y Maiden, 2009; Feil y Spratt, 2001).

Adicionalmente, puede considerarse como una evidencia de la existencia de transferencia lateral de genes en *Leptospira* la aparición de un perfil alélico que parece surgir de la combinación entre otros dos STs, como ocurrió en el caso del el nuevo perfil STN2. En general, las combinaciones particulares de alelos son estables para los STs es decir que la asociación de los mismos no es al azar. Según el modelo de evolución clonal de bacterias y en el marco del MLST, la diversificación ocurre por la aparición de nuevos alelos en alguno de los loci, que determinan la aparición de nuevos STs generando las denominadas variantes de locus simple (SLVs), para luego continuar diversificándose en forma progresiva (Feil et al., 2004). Sin embargo, la generación de un nuevo perfil de tipo “mosaico” es rara, y poco probable si no se explica bajo la hipótesis de recombinación. Este sería un caso donde se quiebra el desequilibrio de ligamiento que subyace a un modelo poblacional de tipo clonal, sugiriendo que la combinación de genotipos ha ocurrido a partir de la transferencia lateral de bloques de ligamiento (Feil y Spratt, 2001).

A pesar de haber obtenido variantes intraespecie e intraserogrupo, se obtuvo un bajo poder discriminatorio (0,65) del esquema 7LT aplicado a la colección descripta (índice de diversidad de Simpson). Asimismo se observó que 14 de las 25 cepas incluidas (56%) fueron indiferenciables ya que presentaron el mismo ST (ST37). Los resultados obtenidos pueden deberse probablemente al sesgo presente en la colección evaluada, debido a que el 48% de las mismas pertenecía, según información previa, al serogrupo Pomona y al hospedador bovino. Esta colección inicial se hallaba disponible en uno de los laboratorios de referencia en Sanidad Animal en Leptospirosis participante en este trabajo, y debido a que la mayoría de las muestras provenían de animales de producción, ello explique el sesgo observado hacia este serogrupo.

Debido a ello, seguidamente se decidió implementar la metodología de MLVA en la misma colección, con el objetivo de poder diferenciar a los aislamientos incluidos en el ST mayoritario observado en aquellos provenientes de bovinos. En este caso se obtuvieron 9 genotipos diferentes, incrementándose el poder discriminatorio a 0.86. Los aislamientos pertenecientes al serogrupo Pomona pudieron ser subdivididos en 4 genotipos distintos, lo que implica una capacidad mayor de discriminación de este serogrupo, al tiempo que también pudieron diferenciarse de aquellos pertenecientes al serogrupo Canicola, lo que no había podido lograrse con el esquema de MLST 7LT.

La elección de marcadores sometidos a presión de selección negativa como los genes del esquema 7LT podrían no ser suficientemente efectivos para describir la variabilidad de la población en estudio considerando el sesgo de la misma en cuanto a aislamientos argentinos. Una estrategia que permitiría aumentar la discriminación sería la implementación de marcadores moleculares de más rápida evolución como las secuencias repetitivas de ADN. Al mismo tiempo, las metodologías de tipificación molecular basadas en secuencias repetitivas poseen ciertas ventajas respecto de aquellas basadas en secuenciación: son más sencillas de implementar en laboratorios de diverso grado de complejidad y a su vez son de rápido análisis. Estos marcadores en general se hallan en zonas no codificantes del genoma, y poseen una tasa de sustitución nucleotídica de varios órdenes de magnitud mayor que las regiones codificantes. Es por esto que los VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) son altamente discriminativos y constituyen buenos marcadores para la tipificación (diferenciación de aislamientos), pero no así para inferir relaciones evolutivas (Pérez-Losada et al., 2013).

Es por ello que para la colección aquí estudiada, donde el número de aislamientos fue reducido, pudo implementarse el método de MLVA. No obstante, si bien esta metodología presentó un poder discriminatorio mayor que el alcanzado por el esquema 7LT, algunos aislamientos que habían sido discriminados mediante éste, no pudieron diferenciarse con MLVA. Ese es el caso del genotipo “b” de VNTR que fue subdividido en ST37 y STN3 en el esquema 7LT. Por lo tanto, se concluyó que ninguna de las dos metodologías exploradas eran suficientemente discriminativas por separado.

En base a ello se decidió realizar un análisis de ambos métodos en conjunto (estrategias MLST y MLVA). Se generó una matriz de datos combinando los genotipos de VNTR con los perfiles alélicos de MLST para crear un nuevo código: STVNTR. Así, en la misma colección de cepas describieron siete STs, nueve VNTRs y 13 STVNTRs aumentando el valor del poder discriminatorio de 0.65 a 0.86 y finalmente a 0.9, respectivamente. Esta matriz de datos se utilizó para realizar un estudio filogenético donde el árbol resultante, presentó cuatro agrupamientos o *clusters* coincidentes con los serogrupos mayoritarios (Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Sejroe): Cada uno de los agrupamientos contenía cepas clasificadas en el mismo serogrupo, permitiendo además confirmar la clasificación de tres cepas cuya serotipificación era dudosa.

En conclusión, si bien la combinación de ambos métodos logró una mayor discriminación de aislamientos, su aplicación sobre colecciones mayores aumentaría la complejidad en el proceso de tipificación. Por un lado, no existen bases de datos de genotipos de MLVA del género *Leptospira* que permitan realizar un análisis local en un contexto de cepas mundiales como con MLST. Por otro, la evaluación de los VNTRs no es altamente procesiva ni comparable objetivamente entre diferentes laboratorios, razón por la cual no existen dichas bases de datos. Además, ambas metodologías estaban limitadas a la aplicación en sólo dos especies patógenas (*L. interrogans* y *L. kirschneri*).

Teniendo en consideración que el MLST tiene un gran número de aplicaciones, tanto en epidemiología local como global, y que sus resultados son objetivos y reproducibles por basarse en secuencias de ADN, se avanzó un paso más en su desarrollo para la tipificación molecular de aislamientos de *Leptospira*.

A partir de la elección de MLST como metodología a optimizar para la tipificación de *Leptospira*, se accedió a un número mayor de cepas cuyas secuencias se encontraban depositadas en la base de datos <http://www.mlst.net> para los loci del esquema 7LT. Simultáneamente fue necesaria la obtención de las secuencias correspondientes al mismo subgrupo de cepas que habían sido tipificadas mediante el otro esquema de MLST disponible, 6LH. Si bien éstas no habían sido depositadas en plataformas *web*, fueron solicitadas a sus correspondientes autores. La intersección entre estas dos colecciones sumada a los aislamientos argentinos disponibles, permitió la exploración de la capacidad de tipificación de 12 loci en un conjunto de 65 cepas, aún limitado a dos especies patógenas, *L. interrogans* y *L. kirschneri*. De este modo se realizó una evaluación de 12 loci que formaban parte de los esquemas de MLST más utilizados (7LT y 6LH), con el fin de obtener una combinación que permitiera la tipificación de especies patógenas dentro del género *Leptospira*, optimizando la capacidad de discriminación de aislamientos. De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios filogenéticos, el algoritmo goeBURST y el análisis comparativo exhaustivo de cada locus, se propuso un esquema de MLST compuesto por siete loci: *adk*, *glmU*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *mreA* y *pntA*. Mediante los estudios mencionados se persiguió la optimización del poder discriminatorio de esta metodología. La nueva combinación incorporó cuatro y tres loci de los esquemas 6LH y 7LT respectivamente incluyendo dos loci no constitutivos (*lipL32* y *lipL42*), siendo que durante la evaluación de los mismos no se encontraron indicios de

selección positiva. Cabe destacar que si bien ambos loci formaban parte del esquema 6LH, los parámetros de selección no habían sido tenidos en cuenta durante su desarrollo (Ahmed et al., 2006).

En esta instancia, el avance paralelo de otros grupos de investigación dedicados a la tipificación molecular de *Leptospira* facilitó el acceso a las secuencias de nuevas cepas (Boonsilp et al., 2013). De este modo pudo ampliarse nuevamente la colección de cepas tipificadas a un total de 116, que se utilizó para la evaluación del esquema de MLST optimizado (7LA). Esta colección permitió incorporar al análisis representantes de las 7 especies patógenas principales de *Leptospira*.

El esquema combinado, al que denominamos 7LA, se aplicó a la colección extendida de 116 cepas, incluyendo aislamientos argentinos y cepas de diversos orígenes geográficos. De este modo se confirmó su validez para la tipificación de siete especies patógenas. Se describieron 96 perfiles alélicos en esta colección, con una relación aislamientos/STs de 1,2 (cada ST describe entre uno y dos aislamientos) y un poder discriminatorio (PD) global de 0,83. Si bien el PD fue menor al obtenido con la combinación de las dos metodologías descriptas (MLVA y MLST, 0.93), debido a lo mencionado previamente respecto de la dificultad en la implementación, se consideró que el PD alcanzado por el esquema 7LA fue satisfactorio. Asimismo, se determinaron los principales genotipos de importancia local (Argentina), denominados ST52 y ST47, vinculados principalmente a animales de producción y a humanos respectivamente. Finalmente, se exploró la existencia de una correlación entre los genotipos determinados por MLST y la clasificación serológica de los aislamientos a nivel de serogrupo. De este modo, se halló que entre los aislamientos de *L. interrogans* (la especie más abundante en la colección), aquellas cepas que pertenecían al mismo genotipo, se correlacionaban con uno o a lo sumo dos serogrupos. Esto ocurrió con los STs predominantes en Argentina, donde se observó la ocurrencia conjunta del ST47 y el serogrupo Icterohaemorrhagiae, el ST52 y el serogrupo Pomona, y el ST3 con los serogrupos Pomona y Canicola. La asociación en sentido inverso no ocurre, dado que los genotipos son altamente diversos, es decir que cepas de un mismo serogrupo presentan una gran diversidad de STs. Sin embargo, la posibilidad de acotar la clasificación serológica a través de un resultado de tipificación molecular sienta un precedente a desarrollar ya que podría aportar a la precisión y a la simplificación de los métodos serológicos (Varni et al., 2014).

Mediante los análisis filogenéticos pudo confirmarse la capacidad del esquema, no solamente para diferenciar entre especies sino también para establecer agrupamientos intraespecíficos entre aquellas cepas genéticamente relacionadas (por ejemplo, STs con alelos compartidos y cepas de un mismo serogrupo).

Una observación que se desprendió del análisis de los árboles individuales de los loci, fue que en algunos casos no se mantuvieron los mismos agrupamientos obtenidos en el dendrograma de secuencias concatenadas (incongruencia topológica). La concatenación de loci supone *a priori* que los genes individuales evolucionaron con una historia filogenética similar. De esta manera, las inferencias basadas en el árbol concatenado asumen que dichos genes no fueron sometidos a procesos de recombinación, conversión génica, transferencia horizontal de genes, entre otros. La confiabilidad de la reconstrucción filogenética a partir de un set de genes concatenados podría ser evaluada desde dos perspectivas diferentes: el soporte de rama y tests de congruencia estadísticos (Thiergart et al., 2014). En caso de existir incongruencias, éstas podrían explicar un agrupamiento de las cepas en el dendrograma que no refleja las relaciones genéticas reales entre las mismas.

Adicionalmente fue posible contextualizar globalmente los genotipos de MLST. La información epidemiológica generada es de utilidad para el conocimiento de las posibles rutas de transmisión de la bacteria, entre hospedadores y también entre regiones geográficas. No obstante, aún es necesaria la tipificación de conjuntos mayores de cepas por cada región geográfica de interés, dado que los datos actuales son muy diversos temporal y espacialmente, lo que dificulta la interpretación de los mismos. Esta diversidad se encuentra también en cuanto a los hospedadores de origen de las cepas, resultando en un muestreo cuya representatividad dependerá de la región a estudiar. Asimismo, es importante recalcar el sesgo existente hacia el aislamiento de la especie *L. interrogans* respecto de las otras especies patógenas, por lo cual la mayoría de las conclusiones relevantes suelen asociarse a esta especie. A pesar de ello, a través de estudios basados en amplificación del loci 16S ARNr es conocida la presencia y circulación de otras especies patógenas en diferentes locaciones y animales reservorios (Ganoza et al., 2006, Matthias et al., 2005), pero los aislamientos de esas otras especies son muy escasos respecto de *L. interrogans*.

Una de las características más importantes del MLST es la posibilidad de establecer comparaciones de resultados a través de bases de datos públicas de secuencias entre distintos laboratorios a nivel

mundial. Teniendo en cuenta los avances logrados por el esquema 7LA y su potencial para unificar las metodologías previas para la tipificación del género *Leptospira*, se implementó el desarrollo de una base de datos específica, la cual se incorporó a la base de datos general de secuencias bacterianas basadas en MLST (<http://pubmlst.org/leptospira/>). De esta manera se hicieron disponibles los resultados aquí generados, permitiendo sumar nueva información en función de establecer nuevas conexiones entre aislamientos de distintos orígenes geográficos, y al mismo tiempo unificando la codificación de alelos.

Asimismo, durante el tiempo de desarrollo de esta tesis hubo importantes avances en el campo de la secuenciación de genomas completos de *Leptospira*. Una iniciativa reciente de la comunidad científica dedicada al estudio de *Leptospira* junto con el Instituto J. Craig Venter llevó a cabo la secuenciación genómica de alrededor de 300 aislamientos provenientes de diferentes lugares del mundo, incluyendo a las nueve especies patógenas conocidas del género (Vinetz 2010, <http://gsc.jcvi.org/projects/gsc/leptospira/index.php>). La disponibilidad de estas secuencias amplió dramáticamente la diversidad de las colecciones de cepas en cuanto a serovares, orígenes geográficos, hospedadores, etc. A partir de la disponibilidad de esta información genómica, el esquema 7LA, ya accesible desde la base de datos pubMLST, fue vinculado además a la aplicación MLST 1.7 que reside en el sitio web www.genomicepidemiology.org. Esta aplicación permite realizar la tipificación *in silico* a partir de secuencias genómicas. Mediante este procedimiento se implementó la tipificación de un espectro más amplio de cepas de todas las especies patógenas (283) que el hasta ahora estudiado, cuyas secuencias genómicas tenían acceso público desde el sitio web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). De esta manera fue posible incorporar una gran variabilidad a la colección tipificada por 7LA, con el objeto de lograr una mejor representación de genotipos a escala global, lo cual es de suma importancia si se quiere establecer una perspectiva generalizada de la situación epidemiológica.

Debido a los indicios de recombinación observados en los análisis previos, con los datos obtenidos de la tipificación de los genomas se realizó únicamente el análisis mediante el algoritmo goeBURST. Este tipo de análisis de conglomerados presenta varias ventajas, tales como la facilidad de interpretación y la creación de una agrupación jerárquica de los aislamientos, que puede proporcionar una visión global de la relación de las cepas en estudio y cómo están conectados los grupos definidos el uno al otro (Francisco et al., 2009). En contraposición al goeBURST,

frecuentemente la topología de los dendrogramas no refleja patrones de ascendencia y es particularmente susceptible a los efectos confusos generados por eventos de recombinación.

En esta instancia se pudo determinar un genotipo principal en los aislamientos del conjunto de secuencias, el ST47, que agrupó al 34% del total de las cepas, y 54 % de los aislamientos de *L. interrogans*. Notablemente, este fue uno de los principales genotipos hallados entre los aislamientos argentinos incluidos en los análisis previos de este trabajo, y coincidentemente en todos los casos las cepas con ST47 pertenecieron al serogrupo Icterohaemorrhagiae. Conociendo que este serogrupo es uno de los principales aislados a partir de ratas, y que las mismas circulan frecuentemente en ambientes urbanos en contacto directo con el hombre, su presencia en humanos reafirma a los hospedadores del género *Rattus* como una importante fuente de transmisión. Además, en Argentina los datos de serotipificación señalan a Icterohaemorrhagiae como el serogrupo más frecuentemente asociado a infecciones humanas, y a Pomona asociado principalmente a infección en cerdos y bovinos. Este hallazgo refuerza la evidencia previa y sostiene la asociación subyacente entre dicho genotipos y serogrupos.

Es necesario observar que en el subconjunto de cepas con ST47, el 80 % provenían de la misma zona geográfica (Brasil), por lo que no podríamos descartar estar en presencia de un mismo clon de *L. interrogans*.

Tradicionalmente la genotipificación de *Leptospira* ha exigido el aislamiento de la bacteria, en algunos casos posiblemente sesgando el cultivo de una especie por sobre otra, particularmente *L. interrogans*, para la cual se cuenta con el mayor número de aislamientos en todas las colecciones estudiadas. Por otra parte, aunque los aislamientos son limitados existe una gran disponibilidad de muestras clínicas provenientes de animales y pacientes humanos que padecieron leptospirosis.

Con el objetivo de poder establecer una clara correlación entre los aspectos genéticos de la bacteria y clínicos de la enfermedad, es necesario desarrollar y aplicar técnicas que permitan identificar dichos genotipos en muestras biológicas. Este tipo de muestras podrían contener genotipos que no están siendo detectados a través del análisis de cultivos, y de este modo escapan al análisis epidemiológico.

Es por eso que decidimos avanzar otro paso en el desarrollo del MLST y adaptar el método para facilitar su aplicación en muestras clínicas. A partir del esquema 7LA resultante de la reevaluación de los esquemas previos, se realizó un procedimiento equivalente, con el objeto de contar con un

número menor de loci (esquema reducido), con la menor disminución posible en la capacidad de discriminación. De este modo se seleccionaron tres loci sobre los siete del esquema 7LA, para conformar un esquema reducido de aplicación simplificada en muestras clínicas. El mismo, denominado 3LA, incluyó a los loci *adk*, *lipL41* y *mreA*, cuya combinación permitió determinar un 93 % del total de STs identificados por los 7 loci en la colección evaluada previamente. Habiendo corroborado analíticamente su eficiencia para la tipificación, el esquema 3LA fue aplicado a un conjunto de muestras clínicas provenientes de humanos. Si bien la información serológica de las muestras estaba disponible, se trabajó deliberadamente en desconocimiento de la misma, a fin de contrastar posteriormente los resultados obtenidos por esta metodología.

De un total de 61 muestras clínicas recibidas, 37 muestras fueron positivas para el análisis del locus 16S ARNr, y entre ellas, las correspondientes a especies patógenas se seleccionaron para la aplicación de 3LA.

Como primer resultado, fue posible determinar la especie de *Leptospira* presente en un 60 % de las muestras recibidas, pero se concluyó que sólo un 54% correspondía a especies patógenas. Posteriormente, la aplicación del esquema 3LA se logró en forma parcial en el 15% de dichas muestras (5/33) y en forma total (para los tres loci) en 10,8 % de las mismas (4/33). Utilizando las muestras para las que se completó el esquema reducido, se realizó un análisis filogenético contextualizando las mismas con cepas obtenidas previamente, logrando agruparlas con aquellas otras de serogrupo cercano. En conclusión, fue posible clasificar una alta proporción de las muestras clínicas por especie, y en un porcentaje menor aproximar su serogrupo sin contar con los datos serológicos previos. La amplificación simultánea de los tres loci está aún en proceso de optimización debido a la heterogeneidad de las muestras y su baja concentración de ADN. Sin embargo, la practicidad de esta metodología sumada a la alta disponibilidad de muestras clínicas permitirían incrementar el conocimiento de variedades circulantes que son de difícil detección mediante el aislamiento (Goarant et al., 2013). En base a estos indicios creemos que el desarrollo de este método es promisorio en el campo de la epidemiología molecular de *Leptospira*.

Como resumen de la aplicación de los esquemas de MLST optimizados (7LA y 3LA) desarrollados y evaluados en colecciones de cepas crecientes a lo largo de esta tesis, se destacan los siguientes hallazgos de orden epidemiológico:

- 1- *L. interrogans* resultó la especie predominante en los aislamientos de todas las colecciones, seguida por *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii*.

- 2- Dentro de la especie *L. interrogans* se encontró un genotipo predominante a escala local, describiendo en su mayoría a los aislamientos argentinos: el ST52. El mismo fue hallado principalmente en animales de producción (bovinos, porcinos) y estuvo asociado al serogrupo Pomona. Además, el ST52 se agrupó con otros cinco STs en el complejo clonal que lo tuvo como genotipo fundador. Todos ellos describieron solamente aislamientos argentinos, y pertenecientes al serogrupo Pomona. Esta evidencia señalaría al ST52 como un genotipo predominante en la población de aislamientos argentinos, y que comenzó a diversificarse a nivel local generando nuevas variantes.
Cuando se analizó la colección final (399 cepas), el ST52 no fue mayoritario a escala mundial, pero se encontró en un número reducido de cepas de otros orígenes geográficos, y en hospedadores humanos y animales salvajes.

- 3- El ST47 fue mayoritario en aislamientos de Argentina, pero también predominó en la colección total, agrupando a más de la cuarta parte de las cepas (26 %) y estuvo particularmente asociado a aislamientos humanos. En todos los casos los aislamientos descritos por este ST correlacionaron con el serogrupo Icterohaemorrhagiae. En cuanto la procedencia de las cepas, en la colección se observó una marcada predominancia de aquellas de origen sudamericano (80 %), con una sobrerrepresentación de cepas de origen brasileño (72 % del total). De este modo, si bien el genotipo también se encontró en cepas de otros continentes predominó en aislamientos sudamericanos. La asociación del ST47 con el serogrupo Icterohaemorrhagiae fue generalizada (para todas las cepas independientemente de su origen geográfico). El carácter prevalente del ST47 junto con su estrecha relación a un solo serogrupo podría indicar que se trata de un genotipo muy estable en la población descrita. De acuerdo a la teoría de expansión clonal que subyace al análisis de goeBURST (Feil et al., 2004), probablemente haya sufrido un proceso de expansión local.

- 4- ST3: resultó un genotipo importante en Argentina, y en la colección global se encontró únicamente en cepas americanas, aunque el número de cepas argentinas continuó siendo mayoritario. En los análisis de asociación de STs se encuentra directamente ligado al ST52, lo cual es consistente respecto de su aparición en cepas de origen argentino (al igual que el ST52). Notablemente, se encontró vinculado a los serogrupos Pomona o Canicola principalmente, y en algunos casos a Icterohaemorrhagiae. Estos indicios sugerirían que se trata de un genotipo menos establecido e intermedio a los fundadores del complejo clonal principal de *L. interrogans*.
- 5- La ampliación de la colección permitió el hallazgo de nuevos genotipos fundadores a partir de la diversidad geográfica de cepas alcanzada. Este fue el caso del ST6 y el ST118.
- 6- El esquema 3LA, a pesar de la reducción en el número de loci, alcanzó el objetivo de proporcionar un genotipo a muestras clínicas con alto poder discriminatorio, y a su vez permitió relacionar el mismo con un número acotado de serogrupos.

El eje principal de este trabajo de tesis consistió en aplicar y optimizar herramientas de tipificación molecular de manera de enriquecer los estudios de epidemiología molecular del género *Leptospira*, con principal interés en las especies patógenas. Hasta la fecha, la bibliografía sobre estudios de epidemiología molecular de esta bacteria no se había concentrado en comprender aspectos poblacionales de la misma. Aún más, no se habían evaluado parámetros básicos de los lineamientos de la técnica MLST como la selección negativa a la que deben estar sometidos los genes seleccionados para los esquemas propuestos. Es por esto que contando con los tres esquemas de MLST presentes en la base de datos <http://www.pubmlst.org> y 399 cepas, se planteó en este trabajo profundizar estos estudios de manera de aportar nuevos datos sobre la dinámica poblacional del género *Leptospira*. Al mismo tiempo que se persiguió dicho objetivo se obtuvo valiosa información sobre este patógeno en nuestro país desconocida hasta el momento, de utilidad en programas de control y métodos de diagnóstico de esta enfermedad, constituyendo el primer trabajo en su tipo realizado en nuestro país.

Conclusiones

8. Conclusiones

- El algoritmo de trabajo establecido en esta tesis, permitió identificar, tipificar y contextualizar a nivel global especies, aislamientos y muestras clínicas de *Leptospira* spp.
- La utilización de un método conjunto entre MLVA y MLST (STVNTR) resultó en un incremento de la discriminación de ambas técnicas por separado al ser aplicadas a un subconjunto de aislamientos argentinos de *Leptospira* spp. encontrándose que existe un genotipo mayoritario entre los aislamientos de serogrupo Pomona.
- La reevaluación de los esquemas de MLST disponibles permitió obtener un nuevo esquema combinado denominado 7LA, que incrementó el poder discriminatorio alcanzado por los esquemas previos. Se obtuvieron perfiles alélicos (STs) mayoritarios circulantes en aislamientos de nuestro país, descritos tanto para humanos como para animales. El esquema 7LA se encuentra disponible para su utilización en una base de datos denominada: pubmlst.org/leptospira.
- Mediante la aplicación del nuevo esquema 7LA, se logró establecer una correlación entre genotipos mayoritarios en Argentina y los serogrupos a los que pertenecen, aportando de esta manera una alternativa complementaria al diagnóstico serológico actual.
- El esquema 7LA se incluyó en la base de datos del Centro para la Epidemiología Genómica, lo que posibilitó la tipificación *in silico* de 283 genomas completamente secuenciados de esta bacteria.
- Se describió un esquema de MLST reducido (3LA) utilizando tan sólo tres de los siete marcadores del esquema 7LA, que facilitó la tipificación molecular directamente a partir de muestras clínicas, sin necesidad de contar con el aislamiento.

- Este trabajo permitió entonces, profundizar el conocimiento de la variabilidad genética del género *Leptospira* y brindar información epidemiológica adecuada para implementarla en programas de control y métodos de diagnóstico de esta enfermedad, constituyendo el primer trabajo en su tipo realizado en nuestro país.

Anexo

Tabla 1. Colección completa de 121 cepas y aislamientos utilizados bajo los diferentes métodos de tipificación (capítulos 1 y 2), incluyendo la serotipificación (en caso de ser conocida), especie y hospedador del cual se realizó el aislamiento.

Orden	Origen	Especie	Patogenicidad	Cepa	Serovar	País	Hospedador	Serogrupo	Tipificación
1	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Comadreja		Argentina	comadreja	Canicola	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
2	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	CañuelasIII		Argentina	porcino	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
3	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	La Cava1		Argentina	roedor	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
4	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	417		Argentina	humano	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
5	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	AK-RFB	Pomona	Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
6	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	CañuelasI		Argentina	porcino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
7	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	CañuelasII		Argentina	porcino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
8	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Corrientes 266		Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
9	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fulton		Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
10	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Marcos Juarez		Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
11	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Marcos Paz		Argentina	porcino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
12	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Pujato		Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
13	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Rojas		Argentina	bovino	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
14	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	V3P		Argentina	roedor	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
15	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Pomona	Pomona	Australia	humano	Pomona	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
16	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	RGA	Icterohaemorrhagiae	Bélgica	humano	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
17	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz L1-130	Copenhageni	Brasil	humano	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
18	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	56601	Lai	China	humano	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
19	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	MY 1039	Portlandvere	Jamaica	humano	Canicola	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
20	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Ictero No.1	Icterohaemorrhagiae	Japón	humano	Icterohaemorrhagiae	VNTR - 7LT - 6LH - 7LA
21	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Longchamps		Argentina	humano	Pomona	VNTR - 7LT
22	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	San Alfredo		Argentina	porcino	Pomona	VNTR - 7LT
23	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	3705 SENASA		Argentina	humano	Sejroe	VNTR - 7LT
24	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	3705 LiW-04-W1		Argentina	humano	Sejroe	VNTR - 7LT
25	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Hond Utrecht IV	Canicola	Holanda	canino	Canicola	VNTR - 7LT

26	bibliografía	<i>L. noguchii</i>	Patógena	Peludo	Argentiniensis	Argentina	Armadillo	Bataviae	7LT - 6LH - 7LA
27	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Bayur C		Argentina	bovino	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
28	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	C020		Argentina	ambiental	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
29	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	E3		Argentina	humano	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
30	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fox		Argentina	zorro	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
31	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	O28		Argentina	canino	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
32	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Rata 5		Argentina	roedor	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
33	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Bayur P		Argentina	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
34	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Bovino bibi		Argentina	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
35	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Corrientes 289		Argentina	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
36	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Macedo_Balcarce		Argentina	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
37	de novo	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Pomona P	Pomona	Argentina	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
38	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Ballico	Australis	Australia	humano	Australis	7LT - 6LH - 7LA
39	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Patane	Broomi	Australia	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
40	bibliografía	<i>L. weilii</i>	Patógena	Celledoni	Celledoni	Australia	humano	Celledoni	7LT - 6LH - 7LA
41	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Valbuzzi	Valbuzzi	Australia	humano	Grippotyphosa	7LT - 6LH - 7LA
42	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Robinson	Robinsoni	Australia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
43	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Zanoni	Zanoni	Australia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
44	bibliografía	<i>L. santarosai</i>	Patógena	Aa 3	Fluminense	Brasil	roedor	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
45	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Pomona Brasil	Pomona	Brasil		Pomona	7LT - 6LH - 7LA
46	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	An 7705	Guaratuba	Brasil	zarigüeya	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
47	bibliografía	<i>L. santarosai</i>	Patógena	Bov.G	Guaricura	Brasil	bovino	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
48	bibliografía	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Nikolaev	Bulgarica	Bulgaria	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
49	bibliografía	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	B81/7	Tsaratsovo	Bulgaria	roedor	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
50	bibliografía	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	1627_Burgas	Balcanica	Bulgaria	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
51	bibliografía	<i>L. interrogans</i>	Patógena	A 6	Nanla	China	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
52	bibliografía	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	L 82	Zhenkang	China	roedor	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
53	bibliografía	<i>L. weilii</i>	Patógena	A 102	Menrun	China	humano	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
54	bibliografía	<i>L. weilii</i>	Patógena	S 590	Mengma	China	humano	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
55	bibliografía	<i>L. alexanderi</i>		L 60	Manhao 3	China	humano	Manhao	7LT - 6LH - 7LA
56	bibliografía	<i>L. weilii</i>	Patógena	H 27	Hekou	China	humano	Mini	7LT - 6LH - 7LA

57	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	K 5	Kunming	China	roedor	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
58	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Sorex Jalna	Sorexjalna	Checoslovaquia	musaraña	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
59	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M 20	Copenhageni	Dinamarca	humano	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
60	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Munchen C90	Muenchen	Alemania	humano	Australis	7LT - 6LH - 7LA
61	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Bangkinang 1	Bangkinang	Indonesia	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
62	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Paidjan	Paidjan	Indonesia	humano	Bataviae	7LT - 6LH - 7LA
63	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Swart	Bataviae	Indonesia	humano	Bataviae	7LT - 6LH - 7LA
64	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Benjamin	Benjamini	Indonesia	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
65	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Bindjei	Bindjei	Indonesia	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
66	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Vleermuis 90 C	Schueffneri	Indonesia	Murciélago	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
67	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	3522 C	Cynopteri	Indonesia	murciélago	Cynopteri	7LT - 6LH - 7LA
68	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Djasiman	Djasiman	Indonesia	humano	Djasiman	7LT - 6LH - 7LA
69	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sentot	Sentot	Indonesia	humano	Djasiman	7LT - 6LH - 7LA
70	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Veldrat Murciélagoavia 46	Javanica	Indonesia	roedor	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
71	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Salinem	Pyrogenes	Indonesia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
72	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	3705	Wolffi	Indonesia	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
73	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Hardjoprajitno	Hardjoprajitno	Indonesia	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
74	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Kipod 179	Vanderhoedeni	Israel	Erizo	Grippotyphosa	7LT - 6LH - 7LA
75	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Lora	Lora	Italia	humano	Australis	7LT - 6LH - 7LA
76	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Poi	Poi	Italia	humano	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
77	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Sari	Mini	Italia	humano	Mini	7LT - 6LH - 7LA
78	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	LT 60-69	Bogvere	Jamaica	roedor	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
79	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Lambwe	Lambwe	Kenia	roedor	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
80	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Julu	Kwale	Kenia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
81	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Kibos	Nyanza	Kenia	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
82	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	136/2/2	Kuwait	Kuwait	roedor	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
83	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fudge	Fugis	Malasia	humano	Australis	7LT - 6LH - 7LA
84	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Moores	Mooris	Malasia	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
85	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Jones	Jonsis	Malasia	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
86	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sumner	Sumneri	Malasia	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA
87	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Gurung	Gurungi	Malasia	humano	Djasiman	7LT - 6LH - 7LA

88	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Smith	Smithi	Malasia	humano	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
89	bibliografia	<i>L. weilii</i>	Patógena	Cox	Coxi	Malasia	humano	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
90	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Abraham	Abramis	Malasia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
91	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Biggs	Biggis	Malasia	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
92	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Marsh	Haemolytica	Malasia	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
93	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Richardson	Ricardi	Malasia	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
94	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT 62-68	Hawain	Nueva Guinea	bandicoot	AUSTRALIS	7LT - 6LH - 7LA
95	bibliografia	<i>L. santarosai</i>	Patógena	735 U	Balboa	Panama	roedor	Murciélagoaviae	7LT - 6LH - 7LA
96	bibliografia	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CZ 320	Kobbe	Panama	roedor	Murciélagoaviae	7LT - 6LH - 7LA
97	bibliografia	<i>L. noguchii</i>	Patógena	CZ 214 K	Panama	Panama	zarigüeya	Panama	7LT - 6LH - 7LA
98	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	C 3	Carlos	Filipinas	anfíbio	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
99	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT 101-69	Losbanos	Filipinas	roedor	Murciélagoaviae	7LT - 6LH - 7LA
100	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT 398	Manilae	Filipinas	roedor	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA
101	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LM 294	Rumania	Rumania	roedor	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
102	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Yezsh 237	Mujunkumi	Rusia	Erizo	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
103	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Erinaceus auritus 670	Erinaceiauriti	Rusia	Erizo	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
104	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	MoskvaV	Grippotyphosa	Rusia	humano	Grippotyphosa	7LT - 6LH - 7LA
105	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	5621	Mozdok	Rusia	roedor	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
106	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Perepelitsin	Tarassovi	Rusia	humano	Tarassovi	7LT - 6LH - 7LA
107	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Weerasinghe	Weerasinghe	Sri Lanka	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
108	bibliografia	<i>L. santarosai</i>	Patógena	Alice	Alice	Sri Lanka	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
109	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Wumalaseña	Ratnapura	Sri Lanka	humano	Grippotyphosa	7LT - 6LH - 7LA
110	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Simon	Gem	Sri Lanka	humano	Icterohaemorrhagiae	7LT - 6LH - 7LA
111	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Piyasena	Ceylonica	Sri Lanka	humano	Javanica	7LT - 6LH - 7LA
112	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Geyaweera	Geyaweera	Sri Lanka	humano	Sejroe	7LT - 6LH - 7LA
113	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	P 2/65	Tunis	Túnez	porcino	Tarassovi	7LT - 6LH - 7LA
114	bibliografia	<i>L. noguchii</i>	Patógena	Fort_Bragg	Fortbragg	ESTADOS UNIDOS	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
115	bibliografia	<i>L. noguchii</i>	Patógena	LSU 1945	Louisiana	ESTADOS UNIDOS	Armadillo	Lousiana	7LT - 6LH - 7LA
116	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT 1026	Kennewicki	ESTADOS UNIDOS	bovino	Pomona	7LT - 6LH - 7LA
117	bibliografia	<i>L. santarosai</i>	Patógena	LSU 1013	Atchafalaya	ESTADOS UNIDOS	zarigüeya	Tarassovi	7LT - 6LH - 7LA
118	bibliografia	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT 64-67	Camlo	Vietnam	humano	Pyrogenes	7LT - 6LH - 7LA

119	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Butembo	Butembo	Zaire	humano	Autumnalis	7LT - 6LH - 7LA
120	bibliografia	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Kisuba	Kisuba	Zaire	humano	Tarassovi	7LT - 6LH - 7LA
121	bibliografia	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Bafani	Bafani	Zaire	humano	Canicola	7LT - 6LH - 7LA

Tabla 2. Conjunto de 65 cepas y aislamientos tipificadas mediante 12 loci de MLST (esquema 7LT y esquema 6LA, Resultados punto 4.1). Se presenta el alelo asignado a cada loci y al final de la tabla el ST correspondiente a cada perfil alélico.

Cepa	Especie	Serogrupo	País	Hospedador	lipL32	lipL41	adk	fadD	glmU	icdA	mreA	pfbK	pntA	rrs2	sucA	tpiA	ST (12L)
136/2/2	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Kuwait	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sumner	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Malasia	Humano	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Comadreja	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Argentina	Comadreja	3	3	3	3	2	3	1	3	3	2	3	3	3
MY1039	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Jamaica	Humano	3	3	3	3	2	3	1	3	3	2	3	3	3
Corrientes266	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	3	3	3	3	2	3	1	3	3	2	3	3	3
Marcos Paz	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Porcino	3	3	3	3	2	3	1	3	3	2	3	3	3
Pomona	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Australia	Humano	4	4	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	4
LM294	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Roumanica	Roedor	2	2	4	2	3	2	3	4	2	3	4	4	5
Hardjoprajitno	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Indonesia	Humano	2	2	4	4	1	2	4	5	2	3	4	5	6
566601	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	China	Humano	2	5	3	2	1	2	5	6	2	3	2	5	7
M 20	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Dinamarca	Roedor	2	5	5	2	1	2	4	7	2	3	4	6	8
Valbuzzi	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Australia	Humano	2	5	5	2	4	4	6	8	4	3	4	7	9
An 7705	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Brasil	Zarigüeya	5	6	6	3	2	5	1	3	3	4	3	3	10
B 81/7	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Bulgaria	Roedor	6	7	7	2	5	6	7	9	5	1	5	8	11
LT 398	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Philippines	Roedor	2	8	5	2	6	3	8	10	6	3	4	9	12
Ballico	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australia	Humano	2	9	8	2	7	2	9	4	7	3	4	6	13
Fudge	<i>L. interrogans</i>	Australis	Malasia	Humano	2	10	5	5	1	2	9	11	2	3	2	6	14
LT 62-68	<i>L. interrogans</i>	AUSTRALIS	Nueva Guinea	Roedor	7	11	9	2	8	7	10	12	8	2	6	10	15
Lora	<i>L. interrogans</i>	Australis	Italy	Humano	3	12	10	3	1	2	11	13	9	3	4	5	16
Nikolaev	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Bulgaria	Humano	6	13	11	2	9	8	12	14	10	5	7	11	17
Butembo	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Zaire	Humano	8	7	12	2	10	9	7	15	11	6	8	8	18
C 3	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Filipinas	Anfibio	9	14	13	2	11	10	9	16	12	3	4	12	19
Lambwe	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Kenia	Roedor	8	15	14	2	10	11	7	15	11	1	9	8	20
Moores	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Malasia	Humano	2	16	5	2	1	12	9	17	2	2	2	6	21
A 6	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	China	Humano	2	17	3	3	1	13	13	18	2	3	2	6	22
Weerasinghe	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Sri Lanka	Humano	2	18	3	6	2	14	9	11	13	2	2	13	23
Swart	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Indonesia	Humano	2	19	3	2	7	15	14	19	14	3	4	6	24
LT 101-69	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Philippines	Roedor	2	20	3	2	7	3	14	19	14	7	4	6	25

Paidjan	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Indonesia	Humano	2	20	3	2	1	2	11	5	2	3	2	5	26
Benjamin	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Indonesia	Humano	2	20	15	2	1	2	11	11	2	3	4	5	27
Bindjei	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Indonesia	Humano	2	20	5	2	1	2	9	20	2	2	2	14	28
Patane	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Australia	Humano	2	21	5	2	7	2	11	21	7	3	4	6	29
Jones	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Malasia	Humano	2	20	16	2	6	3	11	22	2	3	2	6	30
3522C	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Indonesia	Murciélago	8	22	17	2	12	16	7	9	15	1	9	8	31
Djasiman	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Indonesia	Humano	2	17	18	7	1	2	9	11	2	8	2	5	32
Gurung	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Malasia	Humano	2	16	19	2	6	2	5	17	2	3	10	6	33
Sentot	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Indonesia	Humano	2	17	20	2	1	2	4	23	2	9	2	4	34
Simon	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Sri Lanka	Humano	3	23	4	3	2	17	13	3	3	3	3	3	35
Smith	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Malasia	Humano	2	17	3	4	1	2	15	11	2	3	4	6	36
Abraham	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Malasia	Humano	2	2	3	8	1	18	1	24	2	10	2	15	37
Biggs	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Malasia	Humano	2	24	5	4	1	3	9	17	2	11	2	16	38
LT 64-67	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Vietnam	Humano	2	25	21	2	13	3	1	11	2	2	2	5	39
Salinem	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Indonesia	Humano	2	24	3	5	1	3	9	25	2	10	2	13	40
Robinson	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Australia	Humano	2	25	5	2	1	3	9	21	7	10	4	6	41
Zanoni	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Australia	Humano	2	24	22	5	1	19	1	26	12	3	4	17	42
Geyaweera	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Sri Lanka	Humano	2	2	23	9	2	20	11	7	13	12	11	13	43
Marsh	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Malasia	Humano	2	2	24	4	1	2	4	5	2	13	4	5	44
Richardson	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Malasia	Humano	2	2	25	2	6	2	4	17	2	14	12	6	45
3705	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Indonesia	Humano	2	26	26	2	3	2	3	4	2	13	4	4	46
Ictero N°1	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Japón	Humano	2	5	5	2	1	3	4	7	2	3	4	6	47
La Cava 1	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Argentina	Roedor	2	5	5	2	1	3	4	7	2	3	4	6	47
RGA	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Belgica	Humano	2	5	5	2	1	3	4	7	2	3	4	6	47
Fiocruz L1-130	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Brasil	Humano	3	3	5	2	1	3	4	7	2	3	4	6	48
Marcos Juárez	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	10	4	3	3	13	2	16	3	9	2	3	3	49
Fulton	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	10	5	3	3	2	2	1	3	3	3	3	3	50
Pujato	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	10	4	3	3	13	2	1	3	9	2	3	3	51
AK-RFB	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	10	4	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	52
Cañuelas I	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Porcino	10	4	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	52
Cañuelas II	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Porcino	10	4	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	52
V3P	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Argentina	Roedor	10	4	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	52
Cañuelas III	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Argentina	Porcino	3	3	3	2	1	3	4	7	2	2	4	6	53

Pomona_pato	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	2	5	3	2	1	3	4	7	2	3	4	6	54
E 3	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Argentina	Humano	3	3	5	3	2	3	1	27	3	2	3	3	55
Rojas	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Argentina	Bovino	10	4	27	3	2	2	1	3	3	2	3	3	56
Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	ex URSS	Humano	8	7	28	2	14	21	17	28	16	3	13	18	57

Tabla 3. Cepas tipificadas *in silico* a partir de secuencias genómicas (Resultados, sección 7.2). Se indica el ST (*sequence type*) obtenido para cada cepa.

Orden	Especie	Patogenicidad	Cepa	Serovar	País	Tipo de hospedador	Serogrupo	ST (7LA)
1	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Kito	-	Brasil	canino	-	3
2	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV133	Canicola	Brasil	humano	-	3
3	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2655	Canicola	-	-	-	3
4	<i>L. interrogans</i>	Patógena	HAI0156	Copenhageni	Perú	humano	-	3
5	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Brem 329	-	Alemania	equino	-	6
6	<i>L. interrogans</i>	Patógena	56601	Lai	China	humano	Icterohaemorrhagiae	7
7	<i>L. interrogans</i>	Patógena	IPAV	Lai	-	-	-	7
8	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Lai	Lai	China	humano	Icterohaemorrhagiae	7
9	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Lai LPS mutant	Lai	-	-	-	7
10	<i>L. interrogans</i>	Patógena	K56	Manilae	Filipinas	roedor	-	12
11	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M001_Tn_Mutant_Parent	Manilae	-	-	-	12
12	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M1352_LPS_mutant	Manilae	-	-	-	12
13	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M776_fur_mutant	Manilae	-	-	-	12
14	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M874_LA0615_mutant	Manilae	-	-	-	12
15	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UP-OM	Manilae	Filipinas	humano	-	12
16	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4114	-	Brasil	humano	-	47
17	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4117	-	Brasil	humano	-	47
18	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4225	-	Brasil	humano	-	47
19	<i>L. interrogans</i>	Patógena	HAI1594	-	Perú	humano	-	47
20	<i>L. interrogans</i>	Patógena	MMD3731	-	Perú	roedor	-	47
21	<i>L. interrogans</i>	Patógena	200701182	Copenhageni	-	-	-	47
22	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2001025091	Copenhageni	Estados Unidos	humano	-	47
23	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000634	Copenhageni	-	-	-	47
24	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002009669	Copenhageni	-	-	-	47

25	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006972	Copenhageni	-	-	-	47
26	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006982	Copenhageni	-	-	-	47
27	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006007831	Copenhageni	Guyana	humano	-	47
28	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2007005490	Copenhageni	-	-	-	47
29	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz L1-130	Copenhageni	Brasil	humano	Icterohaemorrhagiae	47
30	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV130	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
31	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV192	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
32	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV199	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
33	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV204	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
34	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV212	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
35	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV239	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
36	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV251	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
37	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV256	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
38	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2750	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
39	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2752	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
40	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2755	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
41	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2756 C1	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
42	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2756C6	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
43	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2759	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
44	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2763	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
45	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2766	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
46	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2767	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
47	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2772	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
48	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2776	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
49	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2787	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
50	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2790	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
51	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2791	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
52	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2799	Copenhageni	Brasil	humano	-	47

53	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2804	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
54	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2805	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
55	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2806	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
56	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2807	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
57	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2811	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
58	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2812	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
59	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2816	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
60	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2825	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
61	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2832	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
62	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2841	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
63	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2908	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
64	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2919	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
65	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2933	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
66	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2948	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
67	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2953	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
68	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2958	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
69	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2959	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
70	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV2973	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
71	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3076	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
72	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3086	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
73	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3094	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
74	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3096	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
75	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3213	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
76	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3323	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
77	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3409	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
78	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3726	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
79	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3737	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
80	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3738	Copenhageni	Brasil	humano	-	47

81	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3834	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
82	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV3879	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
83	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4034	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
84	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4108	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
85	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4113	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
86	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4118	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
87	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4152	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
88	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4160	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
89	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4173	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
90	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4174	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
91	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4188	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
92	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4211	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
93	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4212	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
94	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4217	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
95	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV4234	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
96	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz LV999	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
97	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz R154	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
98	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fiocruz R83	Copenhageni	Brasil	humano	-	47
99	<i>L. interrogans</i>	Patógena	HAI0188	Copenhageni	Perú	humano	-	47
100	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT2050	Copenhageni	-	humano	-	47
101	<i>L. interrogans</i>	Patógena	M20	Copenhageni	Dinamarca	humano	Icterohaemorrhagiae	47
102	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2431	Copenhageni	Azores	humano	-	47
103	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2518	Copenhageni	-	-	-	47
104	<i>L. interrogans</i>	Patógena	R066	Copenhageni	Colombia	roedor	-	47
105	<i>L. interrogans</i>	Patógena	R103	Copenhageni	-	-	-	47
106	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Wijnberg	Copenhageni	Brasil	humano	Icterohaemorrhagiae	47
107	<i>L. interrogans</i>	Patógena	201100516	Icterohaemorrhagiae	Guadalupe	humano	-	47
108	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Kantorowic	Icterohaemorrhagiae	Brasil	canino	-	47

109	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2422	Icterohaemorrhagiae	-	-	-	47
110	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2547	Icterohaemorrhagiae	-	-	-	47
111	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2554	Icterohaemorrhagiae	-	-	-	47
112	<i>L. interrogans</i>	Patógena	RGA	Icterohaemorrhagiae	Bélgica	humano	Icterohaemorrhagiae	47
113	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Verdun HP	Icterohaemorrhagiae	Francia	humano	-	47
114	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Verdun LP	Icterohaemorrhagiae	Francia	humano	-	47
115	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006962	Pomona	Egipto	humano	-	52
116	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006968	Pomona	Egipto	humano	-	52
117	<i>L. interrogans</i>	Patógena	CSL10083	Pomona	Estados Unidos	mamífero marino	-	52
118	<i>L. interrogans</i>	Patógena	CSL4002	Pomona	Estados Unidos	mamífero marino	-	52
119	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Fox 32256	Pomona	Estados Unidos	zorro	-	52
120	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Kennewicki LC82-25	Pomona	Estados Unidos	humano	-	52
121	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Pomona	Pomona	Australia	humano	-	52
122	<i>L. interrogans</i>	Patógena	200703203	Australis	Polinesia Franciassa	humano	-	97
123	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LP101	Autumnalis	Tailandia	humano	-	98
124	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006959	Bataviae	-	-	-	99
125	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006976	Bataviae	-	-	-	99
126	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Kariadi-Satu	Bataviae	-	-	-	99
127	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Swart	Bataviae	-	-	-	99
128	<i>L. interrogans</i>	Patógena	HAI0024	Canicola	Perú	humano	-	99
129	<i>L. interrogans</i>	Patógena	L1111	Bataviae	Tailandia	humano	-	100
130	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 08561	Bataviae	Laos	humano	-	101
131	<i>L. interrogans</i>	Patógena	L0996	-	Tailandia	humano	-	102
132	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 08452	-	Laos	humano	-	102
133	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UT234	Bataviae	-	-	-	102
134	<i>L. interrogans</i>	Patógena	L0448	Medanensis	Tailandia	humano	-	102
135	<i>L. interrogans</i>	Patógena	L0887	Medanensis	-	-	-	102
136	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UT053	Medanensis	Tailandia	humano	-	102

137	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 12758	-	Laos	humano	-	103
138	<i>L. interrogans</i>	Patógena	P2529	Bim	-	-	-	103
139	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Brem 137	Bratislava	-	-	-	104
140	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2008720116	Jalna	Croacia	roedor	-	104
141	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2008720117	Jalna	Croacia	roedor	-	104
142	<i>L. interrogans</i>	Patógena	TE 1992	Lora	Tanzania	roedor	-	104
143	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Brem 129	Muenchen	Alemania	equino	-	104
144	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Mallika	Bulgarica	India	humano	-	105
145	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT1962	Canicola	Taiwan	humano	-	106
146	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT1649	Djasiman	Tailandia	humano	-	106
147	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006986	Grippotyphosa	Egipto	humano	-	107
148	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Andaman	Grippotyphosa	Islas Andaman	humano	Grippotyphosa	107
149	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT2186	Grippotyphosa	Tailandia	humano	-	108
150	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 12769	Grippotyphosa	Laos	humano	-	108
151	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 08368	Grippotyphosa	Laos	humano	-	109
152	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 08434	Grippotyphosa	Laos	humano	-	110
153	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 12764	Grippotyphosa	Laos	humano	-	111
154	<i>L. interrogans</i>	Patógena	R499	Hebdomadis	Sri Lanka	humano	-	112
155	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Langkawi	Lai	-	-	-	113
156	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Naam	Naam	Brasil	humano	Icterohaemorrhagiae	114
157	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UT364	Pomona	Tailandia	humano	-	115
158	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006956	Pyrogenes	-	-	-	116
159	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006960	Pyrogenes	Egipto	humano	-	116
160	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006006973	Pyrogenes	Egipto	humano	-	116
161	<i>L. interrogans</i>	Patógena	L0374	Pyrogenes	Tailandia	humano	-	117
162	<i>L. interrogans</i>	Patógena	C10069	-	Tailandia	roedor	-	118
163	<i>L. interrogans</i>	Patógena	R168	Pyrogenes	Sri Lanka	humano	-	118
164	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sri Lanka 30	Pyrogenes	Tanzania	roedor	-	118

165	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sri Lanka 39	Pyrogenes	Tanzania	roedor	-	118
166	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sri Lanka 46	Pyrogenes	Tanzania	roedor	-	118
167	<i>L. interrogans</i>	Patógena	SriLanka1	Pyrogenes	-	-	-	118
168	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Sri Lanka 14	Pyrogenes	Portugal	roedor	-	119
169	<i>L. interrogans</i>	Patógena	SriLanka2	Pyrogenes	-	-	-	120
170	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Szwajizak	Szwajizak	Australia	humano	mini?	121
171	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Duyster	Valbuzzi	-	-	Grippotyphosa	122
172	<i>L. interrogans</i>	Patógena	Valbuzzi	Valbuzzi	Australia	humano	Grippotyphosa	122
173	<i>L. interrogans</i>	Patógena	LT2156	Zanoni	Australia	humano	-	123
174	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000621	-	Estados Unidos	humano	-	124
175	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000623	-	Estados Unidos	humano	-	124
176	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000624	-	Estados Unidos	humano	-	124
177	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000626	-	Estados Unidos	humano	-	124
178	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000631	-	Estados Unidos	humano	-	124
179	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2002000632	-	Estados Unidos	humano	-	124
180	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2003000735	-	Estados Unidos	humano	-	124
181	<i>L. interrogans</i>	Patógena	2006001854	-	Tailandia	humano	-	125
182	<i>L. interrogans</i>	Patógena	FPW1039	-	Tailandia	humano	-	126
183	<i>L. interrogans</i>	Patógena	FPW2026	-	Tailandia	humano	-	127
184	<i>L. interrogans</i>	Patógena	HAI1536	-	Perú	humano	-	128
185	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 09600	-	Laos	humano	-	129
186	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 12621	-	Laos	humano	-	130
187	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UI 13372	-	Laos	humano	-	131
188	<i>L. interrogans</i>	Patógena	UT126	-	Tailandia	humano	-	132
189	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	1051	Bim	Barbados	canino	Autumnalis	133
190	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	PUO 1247	Bim	Estados Unidos	humano	-	133
191	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	MMD1493	-	Perú	Bat	-	134
192	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	RM52	Grippotyphosa	Estados Unidos	porcine	Grippotyphosa	134

193	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Brem 179	Valbuzzi	-	-	-	134
194	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Nikolaev	Bulgarica	Bulgaria	humano	-	135
195	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	3522 CT	Cynopteri	Indonesia	bat	-	136
196	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Brem 127 Duyster	Grippotyphosa	-	-	-	137
197	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Duyster-Boelhouwer	Grippotyphosa	-	-	-	137
198	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Moskva	Grippotyphosa	Rusia	humano	Grippotyphosa	137
199	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	200702274	Valbuzzi	Francia	humano	-	137
200	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	H1	-	Tailandia	humano	-	138
201	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	UT130	Grippotyphosa	-	-	-	138
202	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Brem 166	Mozdok	-	-	-	139
203	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Vehlefans 2	Mozdok	Holanda	bovino	-	139
204	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	Vehlefans 3	Mozdok	Portugal	roedor	-	139
205	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	B 81/7 type 3/Tsaratsovo	Mozdok	-	-	-	140
206	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	RM1	Sokoine	Tanzania	bovino	-	141
207	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	200801774	-	Mayotte	humano	-	142
208	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	200801925	-	Mayotte	humano	-	143
209	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	200802841	-	Mayotte	humano	-	143
210	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	200803703	-	Mayotte	humano	-	143
211	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	2008720114	-	Croacia	roedor	-	144
212	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	H2	-	Tailandia	humano	-	145
213	<i>L. kirschneri</i>	Patógena	JB	-	Iran	humano	-	146
214	<i>L. santarosai</i>	Patógena	7	Arenal	-	-	-	147
215	<i>L. santarosai</i>	Patógena	11	Arenal	-	-	-	148
216	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CBC613	-	Perú	bovino	-	149
217	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CBC523	-	Perú	bovino	-	150
218	<i>L. santarosai</i>	Patógena	200403458	-	Guadalupe	humano	-	151
219	<i>L. santarosai</i>	Patógena	JET	-	Colombia	humano	-	152
220	<i>L. santarosai</i>	Patógena	LT 821	Shermani	Taiwan	humano	-	152

221	<i>L. santarosai</i>	Patógena	MOR084	-	Perú	humano	-	153
222	<i>L. santarosai</i>	Patógena	200702252	-	Guadalupe	humano	-	154
223	<i>L. santarosai</i>	Patógena	HAI1380	-	Perú	humano	-	154
224	<i>L. santarosai</i>	Patógena	HAI134	-	Perú	humano	-	155
225	<i>L. santarosai</i>	Patógena	HAI821	-	Perú	humano	-	156
226	<i>L. santarosai</i>	Patógena	ZUN179	-	Perú	humano	-	157
227	<i>L. santarosai</i>	Patógena	2000027870	-	Estados Unidos	humano	-	158
228	<i>L. santarosai</i>	Patógena	2000030832	-	Estados Unidos	humano	-	159
229	<i>L. santarosai</i>	Patógena	ST188	-	Trinidad y Tobago	canino	-	160
230	<i>L. santarosai</i>	Patógena	1342KT	Shermani	Panamá	humano	-	161
231	<i>L. santarosai</i>	Patógena	Oregon	Szwajizak	Estados Unidos	bovino	-	162
232	<i>L. santarosai</i>	Patógena	AIM	-	Colombia	humano	-	163
233	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CBC1416	-	Perú	bovino	-	164
234	<i>L. santarosai</i>	Patógena	HAI1349	-	Perú	humano	-	165
235	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CBC1531	-	Perú	bovino	-	166
236	<i>L. santarosai</i>	Patógena	MAVJ 401	Arenal	Costa Rica	humano	-	167
237	<i>L. santarosai</i>	Patógena	CBC379	-	Perú	porcine	-	168
238	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	L550	Hardjo-bovis	Australia	humano	Sejroe	169
239	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Lely 607	Hardjo-bovis	Holanda	bovino	-	169
240	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Sponselee	Hardjo-bovis	Holanda	bovino	Sejroe	169
241	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Sponselee CDC	Hardjo-bovis	Holanda	bovino	Sejroe	169
242	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	JB197	Hardjo-bovis	Estados Unidos	bovino	Sejroe	170
243	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Noumea 25	-	Nueva Caledonia	humano	-	171
244	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200801910	Castellonis	Guadalupe	humano	-	171
245	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	UI 09149	-	Laos	humano	-	172
246	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	L0066	Javanica	Tailandia	humano	-	172
247	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	L0864	Javanica	-	-	-	172
248	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	MK146	Javanica	Tailandia	humano	-	172

249	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	UI 09931	Javanica	Laos	humano	-	172
250	ND	ND	B5-022	-	Tanzania	anfibio	-	173
251	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	TE 0159	Kenya	-	-	-	173
252	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200901116	Mini	Mayotte	humano	-	174
253	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200701203	-	Mayotte	humano	-	175
254	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200801926	-	Mayotte	humano	-	175
255	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	201000851	Mini	Mayotte	humano	-	175
256	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200901868	Pomona	Mayotte	humano	-	176
257	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	200901122	-	Mayotte	humano	-	177
258	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Brem 307	-	Alemania	equino	-	178
259	<i>L. borgpetersenii</i>	Patógena	Brem 328	-	Alemania	equino	-	178
260	<i>L. noguchii</i>	Patógena	Cascata	-	Brasil	humano	-	179
261	<i>L. noguchii</i>	Patógena	2007001578	-	Estados Unidos	humano	-	180
262	<i>L. noguchii</i>	Patógena	2001034031	-	Estados Unidos	humano	-	181
263	<i>L. noguchii</i>	Patógena	Bonito	-	Brasil	humano	-	182
264	<i>L. noguchii</i>	Patógena	1993005606	-	Estados Unidos	humano	-	183
265	<i>L. noguchii</i>	Patógena	2006001870	-	Estados Unidos	humano	-	184
266	<i>L. noguchii</i>	Patógena	CZ214	Panamá	Panamá	zarigüeya	-	185
267	<i>L. noguchii</i>	Patógena	Hook	-	Brasil	canino	-	186
268	<i>L. noguchii</i>	Patógena	ZUN142	Autumnalis	Perú	humano	-	187
269	<i>L. weilii</i>	Patógena	LNT 1194	-	-	-	-	188
270	<i>L. weilii</i>	Patógena	UI 14631	-	-	-	-	189
271	<i>L. weilii</i>	Patógena	LNT 1234	-	Laos	humano	-	190
272	<i>L. weilii</i>	Patógena	2006001855	-	Tailandia	humano	-	191
273	<i>L. weilii</i>	Patógena	2006001853	-	Tailandia	humano	-	192
274	<i>L. weilii</i>	Patógena	LT2116	Topaz	Australia	humano	-	193
275	<i>L. weilii</i>	Patógena	ICFT	Ranarum	Estados Unidos	equino	-	194
276	<i>L. weilii</i>	Patógena	UI 13098	-	Laos	humano	-	195

277	<i>L. alstonii</i>	Patógena	80-412	Pingchang	China	anfibio	-	196
278	<i>L. alstonii</i>	Patógena	79601	Sichuan	China	anfibio	-	196
279	<i>L. kmetyi</i>	Patógena	Bejo-Iso9	Malasia	Malasia	environmental	Tarassovi	197
280	<i>L. alexanderi</i>	Patógena	L 60	Manhao	-	-	-	ND
281	ND	ND	Fiocruz LV3954	-	Brasil	humano	-	198
282	ND	ND	Fiocruz LV4135	-	Brasil	humano	-	198
283	ND	ND	P2653	-	China	roedor	-	199
284	<i>L. fainei</i>	Intermedia	BUT 6	Hurstbridge	-	-	-	ND
285	<i>L. licerasiae</i>	Intermedia	ATCC BAA-1110	-	-	-	-	ND
286	<i>L. licerasiae</i>	Intermedia	MMD4847	-	-	-	-	ND
287	<i>L. licerasiae</i>	Intermedia	MMD0835	Varillal	-	-	-	ND
288	<i>L. licerasiae</i>	Intermedia	VAR 010	Varillal	-	-	-	ND

Tabla 4. Muestras clínicas aplicadas a la determinación de especie y tipificación mediante el esquema 3LA. Como primer paso se aplicó la amplificación del loci 16S ARNr, y en caso de resultar positiva, se procedió a amplificar los loci del esquema. ND: no determinado.

ID	Tipo de muestra	qPCR LipL32		16S rRNA PCR	Especie	3LA			Provincia
						adk	LipL41	mreA	
1	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
2	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
5	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Salta
6	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Entre Ríos
7	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
8	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
12	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
13	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
14	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
21	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
22	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
27	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
28	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
29	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
31	ADN de suero	+	+		<i>L. borgpetersenii</i>	-	+	+	Santa fe
37	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	+	+	+	Santa fe
38	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
39	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
40	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
46	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
56	ADN de suero	+	-		ND	-	-	-	Santa fe
59	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	+	-	+	Santa fe
64	ADN de suero	+	+		<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos

73	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
92	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Santa fe
99	ADN de suero	+	+	<i>L. kirschneri</i>	-	-	-	Entre Ríos
105	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Entre Ríos
116	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Chaco
118	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Entre Ríos
120	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
123	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Santa fe
129	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
130	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
131	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
132	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Entre Ríos
133	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
135	ADN de suero	+	-	ND	-	-	-	Entre Ríos
7	Suero	+	-	ND	-	-	-	Santa fe
8	Suero	+	-	ND	-	-	-	Santa fe
120	Suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
136	ADN de suero	+	+	ND	ND	ND	ND	Santa fe
139	ADN de suero	+	+	<i>L. meyeri</i>	NR	NR	NR	Santa fe
143	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
157	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
172	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
174	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Entre Ríos
175	ADN de suero	+	+	<i>L. meyeri</i>	NR	NR	NR	Entre Ríos
178	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
179	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	Santa fe
180	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
182	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe

196	ADN de suero	+	+	ND	ND	ND	ND	Entre Ríos
197	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Santa fe
431	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	-	-	Buenos Aires
437	ADN de sangre	+	-	ND	-	-	-	Santa fe
439	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	Santa fe
452	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	Santa fe
464	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	Buenos Aires
466	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	+	-	Santa fe
471	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	+	-	-	Santa fe
477	ADN de suero	+	+	<i>L. interrogans</i>	-	-	-	La Pampa

Tabla 5. Colección de 116 cepas y aislamientos tipificados mediante el esquema 7LA (capítulo 2).

Orden	Origen	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa	País	Hospedador	ST
1	base de datos	<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60	China	humano	81
2	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Balcanica	1627_Burgas	Bulgaria	humano	60
3	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Pyrogenes	Kwale	Julu	Kenya	humano	75
4	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Nyanza	Kibos	Kenya	humano	77
5	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Kisuba	Kisuba	Zaire	humano	79
6	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Zhenkang	L 82	China	roedor	80
7	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tunis	P 2/65	Tunesia	porcino	85
8	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perpelitsin	Russia	humano	87
9	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Ceylonica	Piyasena	Sri Lanka	humano	88
10	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Poi	Poi	Italy	humano	89
11	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Mini	Sari	Italy	humano	91
12	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Sorexjalna	Sorex Jalna	Czechoslovakia	musaraña	92
13	base de datos	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46	Indonesia	roedor	93
14	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		417	Argentina	humano	52
15	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705	Indonesia	humano	46
16	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Lai	56601	China	humano	7
17	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Kuwait	136/2/2	Kuwait	roedor	1
18	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Nanla	A 6	China	humano	22
19	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Abramis	Abraham	Malaysia	humano	37
20	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	AK-RFB	Argentina	bovino	52
21	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Guaratuba	An 7705	Brazil	zarigüeya	10
22	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico	Australia	humano	13
23	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Bangkinang	Bangkinang 1	Indonesia	humano	66
24	de novo	<i>L. interrogans</i>	Canicola		Bayur C	Argentina	bovino	3
25	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Bayur P	Argentina	bovino	52
26	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Benjamini	Benjamin	Indonesia	humano	27
27	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Biggis	Biggs	Malaysia	humano	38
28	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Bindjei	Bindjei	Indonesia	humano	28
29	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Bovino bibi	Argentina	bovino	52
30	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Carlos	C 3	Philippines	anfibio	19
31	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		C020	Argentina	ambiental	47

32	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		CañuelasI	Argentina	porcino	52
33	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		CañuelasII	Argentina	porcino	52
34	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		CañuelasIII	Argentina	porcino	53
35	de novo	<i>L. interrogans</i>	Canicola		Comadreja	Argentina	comadreja	3
36	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Corrientes 266	Argentina	bovino	3
37	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Corrientes 289	Argentina	bovino	3
38	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman	Indonesia	humano	32
39	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		E3	Argentina	humano	54
40	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz L1-130	Brazil	humano	48
41	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		Fox	Argentina	zorro	47
42	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Australis	Fugis	Fudge	Malaysia	humano	14
43	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Fulton	Argentina	bovino	50
44	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Geyaweera	Geyaweera	Sri Lanka	humano	43
45	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Gurungi	Gurung	Malaysia	humano	33
46	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	Hardjoprajitno	Indonesia	humano	6
47	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ictero No.1	Japan	humano	47
48	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Jonsis	Jones	Malaysia	humano	30
49	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		La Cava1	Argentina	roedor	47
50	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Roumanica	LM 294	Roumanica	roedor	5
51	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Australis	Lora	Lora	Italy	humano	16
52	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Losbanos	LT 101-69	Philippines	roedor	25
53	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Kennewicki	LT 1026	USA	bovino	3
54	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Manilae	LT 398	Philippines	roedor	12
55	base de datos	<i>L. interrogans</i>	AUSTRALIS	Hawain	LT 62-68	New Guinea	marsupial	15
56	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Camlo	LT 64-67	Vietnam	humano	39
57	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20	Denmark	humano	8
58	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Macedo_Balcarce	Argentina	bovino	52
59	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Marcos Juarez	Argentina	bovino	49
60	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Marcos Paz	Argentina	porcino	3
61	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Haemolytica	Marsh	Malaysia	humano	44
62	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Mooris	Moore	Malaysia	humano	21
63	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Australis	Muenchen	Munchen C90	Germany	humano	16
64	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Portlandvere	MY 1039	Jamaica	humano	3
65	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		O28	Argentina	canino	47

66	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Paidjan	Paidjan	Indonesia	humano	26
67	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Broomi	Patane	Australia	humano	29
68	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona	Australia	humano	4
69	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona Brazil	Brazil		58
70	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona P	Argentina	bovino	55
71	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Pujato	Argentina	bovino	51
72	de novo	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae		Rata 5	Argentina	roedor	47
73	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	Belgium	humano	47
74	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Ricardi	Richardson	Malaysia	humano	45
75	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Robinsoni	Robinson	Australia	humano	41
76	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		Rojas	Argentina	bovino	56
77	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	Indonesia	humano	40
78	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot	Sentot	Indonesia	humano	34
79	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Gem	Simon	Sri Lanka	humano	35
80	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Smithi	Smith	Malaysia	humano	36
81	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Sumneri	Sumner	Malaysia	humano	2
82	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart	Indonesia	humano	24
83	de novo	<i>L. interrogans</i>	Pomona		V3P	Argentina	roedor	52
84	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi	Australia	humano	9
85	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Schueffneri	Vleermuis 90 C	Indonesia	murciélago	94
86	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Weerasinghe	Weerasinghe	Sri Lanka	humano	23
87	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Mujunkumi	Yezsh 237	Russia	erizo	96
88	base de datos	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Zanoni	Zanoni	Australia	humano	42
89	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Mozdok	5621	Russia	roedor	59
90	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C	Indonesia	murciélago	31
91	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Tsaratsovo	B81/7	Bulgaria	roedor	11
92	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Canicola	Bafani	Bafani	Zaire - P rico?	humano	65
93	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo	Butembo	Zaire	humano	18
94	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Erinaceauriti	Erinaceus auritus 670	Russia	Erizo	72
95	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Kunming	K 5	China	roedor	76
96	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Vanderhoedeni	Kipod 179	Israel	Erizo	78
97	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Lambwe	Lambwe	Kenya	roedor	20
98	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Bogvere	LT 60-69	Jamaica	roedor	84
99	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	MoskvaV	Russia	humano	57

100	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Bulgarica	Nikolaevo	Bulgaria	humano	17
101	base de datos	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Ratnapura	Wumalasena	Sri Lanka	humano	95
102	base de datos	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K	Panama	zarigüeya	70
103	base de datos	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis	Fortbragg	Fort_Bragg	USA	humano	73
104	base de datos	<i>L. noguchii</i>	Lousiana	Louisiana	LSU 1945	USA	Armadillo	83
105	base de datos	<i>L. noguchii</i>	Murciélagaviae	Argentiniensis	Peludo	Argentina	Armadillo	86
106	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Murciélagaviae	Balboa	735 U	Panama	roedor	61
107	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Javanica	Fluminense	Aa 3	Brazil	roedor	63
108	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Autumnalis	Alice	Alice	Sri Lanka	humano	64
109	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	Bov.G	Brazil	bovino	67
110	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Murciélagaviae	Kobbe	CZ 320	Panama	roedor	71
111	base de datos	<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atchafalaya	LSU 1013	USA	zarigüeya	82
112	base de datos	<i>L. weilii</i>	Javanica	Menrun	A 102	China	humano	62
113	base de datos	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni	Australia	humano	68
114	base de datos	<i>L. weilii</i>	Javanica	Coxi	Cox	Malaysia	humano	69
115	base de datos	<i>L. weilii</i>	Mini	Hekou	H 27	China	humano	74
116	base de datos	<i>L. weilii</i>	Javanica	Mengma	S 590	China	humano	90

Bibliografía

10. Bibliografía

- AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico) (2002).** Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina. Comisión Científica sobre leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Serie Enfermedades Transmisibles. *Fundación Mundo Sano*.
- Adler B, y de la Peña Moctezuma A (2010).** Leptospira and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-96.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA y Hartskeerl RA (2006).** Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 28
- Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, et al. (2011).** Comparison of Two Multilocus Sequence Based Genotyping Schemes for *Leptospira* Species. *PLoS Negl Trop Dis* 5(11).
- Alonso-Andicoberry C, García-Peña FJ, Pereira-Bueno J, Costas E y Ortega-Mora LM (2001).** Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev Vet Med* 52: 109-17.
- Argento E, Barriola J, Caminoa R, Draghi MG, Saraví M, Seijo A y Stiebel C (1994).** Manual de Leptospirosis de la Comisión Científica sobre Leptospirosis, de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD) pág. 8.
- Argento E, Carminoa R, Draghi, MG, Dorta de Mazzonelli, G, Mazzonelli J, Seijo A, Stiebel C, Deodato B, Bardon JC, di Santo L, Fusco S, Koval A, Rossetti C, Salas L, Scialfa E, Tealdo M y Vanasco B. (2006)** Informe sobre Leptospirosis en Argentina. Comisión Científica sobre Leptospirosis de la República Argentina (CCLA) Editado por Fundación Mundo Sano. Cap. Vacunas y Vacunación pág 41-54.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E y Vinetz JM; Peru-United States Leptospirosis Consortium (2003).** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-71.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG y Peacock SJ (2013).** A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e1954.
- Borg-Petersen C y Fagraeus A (1927).** The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 26: 555-567.

- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Wevant RS** (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 49: 839-858.
- Brown PD, Levett, PN** (1997). Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction Endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR of low stringency PCR. *J Med Microbiol* 46: 176-181.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK y Adler B** (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 14560-14565.
- Cacchione R, Castelli E, Saraví MA, Martinez E** (1980). Difusión e importancia de la Leptospirosis animal y humana en la Argentina. *Med. Vet.*, 61: 236-245.
- Caimi K, Varni, V, Melendez Y, Koval A, Brihuega B, y Ruybal, P** (2012). A combined approach of VNTR and MLST analysis: improving molecular typing of Argentinean isolates of *Leptospira interrogans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 644-651
- Cerqueira GM, McBride AJ, Picardeau M, Ribeiro SG, Moreira AN, Morel V, Reis MG, Ko AI y Dellagostin OA** (2009). Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. *J Med Microbiol* 58: 1173-1181
- Charon NW y Goldstein S** (2002). Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet* 36: 37-73.
- Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC y Yang CW** (2012). Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene* 511: 364-70.
- Clarridge JE 3rd** (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840-862
- Cole JR, Sulzer CR. y. Pursell AR** (1973). Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 25: 976-980.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM y Tiedje JM** (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37 (Volumen de Base de Datos).
- Daher E, Zanetta DM, Cavalcante MB y Abdulkader RC** (1999). Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg* 61: 630-634.

- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P y Andersen GL** (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-5072
- Dick A y Phil MA** (2003) Actualización Reproductiva. Pérdidas económicas por aborto bovino en rodeos lecheros. *Rev. Taurus* Año 5 N° 17.
- Dikken H y Kmety E** (1978). Serological typing methods of leptospire, p. 259–307. En T Bergan y JR Norris (ed.). *Methods in Microbiology*, vol. 11. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B y Daijardin JB** (1997). Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin. Infect. Dis.* 25:720–724
- Elizalde M** (2008). Ministerio de Salud Provincia de Entre Ríos, Argentina. El Diario de Paraná.
- Ellinghausen HC Jr y McCullough WG** (1965). Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: A Serum-Free Medium Employing Oleic Albumin Complex. *Am J Vet Res* 26: 39-44.
- Ellinghausen HC Jr. y McCullough WG** (1965). Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res* 26: 45-51.
- Ellis WA** (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 10: 463–478.
- Ellis WA y Michno SW** (1976). Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. *Vet Rec* 99: 387-391.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP y Spratt BG** (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J of Bacteriol* 186: 1518-1530.
- Feil EJ y Spratt BG** (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* 55: 561 -590.
- Faine S, Adler B, Bolin C y Perolat P** (1999) *Leptospira and leptospirosis* 2nd ed. MediSci. Melbourne, Australia. p: 272.
- Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M y Carriço JA** (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10: 152.
- Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, et al.** (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 3(8): e308.
- Goarant, C** (2014). Leptospirosis: time to move to molecular epidemiology: comments on "Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide" by Varni and colleagues. *Infection, Genetics and Evolution* 21:484-485.

- Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GL, van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA y Terpstra WJ** (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 139: 1691-1700.
- Gideon: Base de datos de Enfermedades Infecciosas** [consultado Diciembre 2013]. <http://www.gideononline.com/>.
- Goloboff PA, Farris JS y Nixon, KC** (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Guidugli F, Castro AA y Atallah AN** (2000). Antibiotics for treating leptospirosis (Cochrane Review), Biblioteca Cochrane, Vol 2, Oxford, Reino Unido.
- Haake DA** (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146: 1491-504.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA** (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501
- Herrmann JLE, Bellenger P, Perolat G, Baranton G y Saint Girons I** (1992). Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol* 30: 1696–1702.
- Hovind-Hougen K** (1976). Determination by means of electron microscopy of morphological criteria of value for classification of some spirochetes, in particular treponemes. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 255: 1-41.
- Hookey JV** (1992). Detection of leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Letters* 90: 267-274.
- Hunter PR y Gaston MA** (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465-2466.
- Johnson RC y Roger P** (1967). Metabolism of leptospire. II. The action of 8-azaguanine. *Can J Microbiol* 13: 1621-1629.
- Jolley KA, Feil EJ, Chan MS y Maiden MCJ** (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17: 1230-1231.
- Jolley KA, Chan MS y Maiden MCJ** (2004). mlstdbNet–distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5: 86.
- Jolley KA y Maiden MCJ** (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11: 595.
- King D Soller M y Kashi Y** (1997). Evolutionary turning knobs. *Endeavour* 21: 36.
- Kmety E y Dikken H** (1993). Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen, The Netherlands. Pág 104.

- Ko AI, Goarant C y Picardeau M** (2009). *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen *Nat Rev Microbiol* 7: 736–747.
- Koizumi N y Watanabe H** (2005). Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med* 51: 210-214.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM y Lund O** (2012). Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-1361.
- Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM y Fouts DE** (2014). Leptospirosis pathogenomics. *Pathogens* 10: 280-308
- Leon A, Pronost S, Fortier G, Andre-Fontaine G, y Leclercq R** (2010). Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *J Clin Microbiol* 48: 581-585.
- LERG Abdollahpour G, Diguimbaye C, Hartskeerl R, Ko A, Reingold A, Suputtamongkol Y, Vijayachari P, Vinetz P, Yip P y Zinsstag J** (2011). Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Ginebra, Suiza, 2010. Organización Mundial de la Salud.
- Levett PN** (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
- Levett PN** (2003). Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36 (4): 447-452.
- López S y Koval A** (2011) Evaluación de la cepa vacunal AKRFB de *Leptospira interrogans* serovar Pomona frente a 3 cepas virulentas aisladas de bovinos en Argentina. *Rev Vet Arg* 28: 36-47.
- Macedo S** (2005). Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 22 (4).
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M y Spratt BG** (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140-3145.
- Maiden MCJ** (2006). Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561-588.
- McClain JLB, Ballou WR, Harrison SM y Steinweg DL** (1984). Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med* 100: 696–698.
- Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G y Picardeau M** (2005). Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. *J Clin Microbiol* 43: 539-545.
- Martin L. y A. Pettit L** (1918). Serodiagnostic de la spirochaetose ictero-haemorrhagique. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* 42: 672–675

- Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ, Calderón M, Willig MR, Pacheco V, Gotuzzo E, Gilman RH, Vinetz J** (2005). Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by Bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(5): 964–974.
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G y Saint Girons I** (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30: 2219-2224.
- Monahan AM, Miller IS y Nally JE** (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 107: 707-716
- Moral M, Laplume H, Sardi F, Samartino L, Vanasco B, Cudós C, San Juan J, Seijo A, Farace MI, Antman J, Giovachini C, Casas N y Geffner L** (2014). Leptospirosis. Diagnóstico de Leptospirosis. Guía para el Equipo de Salud. Enfermedades infecciosas. Ministerio de Salud. Ed. 9.
- Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA y Ahmed N** (2010). Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS One* 5: e12637.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jerônimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC y Van Sluys MA** (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 186: 2164-2172.
- Organización Mundial de la Salud (OMS)** (2008). Leptospirosis Humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008. Serie de manuales técnicos 12, pág 127.
- Organización Panamericana de la Salud** (1998). Impact of Hurricane Mitch on Central America. *Epidemiol. Bull.* 19:1–13.
- Pavan ME, Cairó F, Brihuega B, Samartino L** (2008). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31(1): 37–45.
- Pavan ME, Cairó F, Pettinari MJ, Samartino L y Brihuega B** (2011). Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34; 135-141.
- Pavón y Maiden** (2009). Multilocus Sequence Typing. *Molecular Epidemiology of Microorganisms, Springer Protocols*. Ed. Caugant D, Capítulo 11.

- Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA** (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 38–53.
- Perolat P, Merien F, Ellis WA y Baranton G** (1994) Characterization of *Leptospira* isolates from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J Clin Microbiol* 32: 1949-1957.
- Picardeau M** (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43: 1–9
- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C y Adler B** (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 3: e1607.
- Plank R y Dean D** (2000) Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2: 1265-1276.
- Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P y Baranton G** (2000). Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 151: 333–341
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG y Zhao GP** (2003). Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature* 422: 888 –893.
- Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, Lehmann JS, Purushe J, Sanka R, Torres M, Webster NJ, Vinetz JM y Matthias MA** (2012). Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1853.
- Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG y Yoshida S** (2013). *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2457-2462
- Schüffner, W y Mochtar A** (1927). Versuche sur Aufteilung von Leptospirenstämmen, mit einleitenden Bemerkungen über den Verlauf von Agglutination und Lysis. *Zentbl Bakteriol* 101: 405–41
- Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J y Gallicchio O** (2010). Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 42: 126-128.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Céspedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, López Liñán R, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, Vinetz JM; Peru-United States**

- Leptospirosis Consortium** (2005). Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 40: 343-351.
- Seijo A, Draghi G, Dorta de Mazzonelli G, Mazzonelli J, Stiebel C, Argento E, Caminoa R, Deodato B y colaboradores de la CCLA** (2002). Informe sobre leptospirosis en la República Argentina. Fundación Mundo Sano, Bs As. Serie Enfermedades Transmisibles, publicación monográfica 3.
- Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML y Smythe LD** (2005). Development of a Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4: 1-10.
- Smith JM** (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34: 126-129.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M y Spratt BG.** (1993). How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4384-4388.
- Srivastava SK** (2006). Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *IJMM* 24: 331-336
- Stanchi NO** (2006). Leptospiras y Borrelias en Microbiología Biomédica 2da Ed. Basualdo JA y de Torres RA. Atlante. Buenos Aires. Cap 45: 502-508.
- Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M y Otto TD** (2012). A post assembly genome improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nature Protocols* 7: 1260-1284.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M y Kumar S** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molec Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Terpstra WJ** (1992), Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leiden* 60: 79-87.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP y Peacock SJ** A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with Human Leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e56.
- Thiergart T, Landan G, Martin WF** (2014). Concatenated alignments and the case of the disappearing tree. *BMC Evol Biol* 14(1):2624.
- Tibayrenc M** (2009). Microbial molecular epidemiology: an overview. *Methods Mol Biol* 551: 1-12.
- Tomasini N, Lauthier JJ, Llewellyn MS y Diosque P** (2013). MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms. *Infect Genet Evol* 20: 188-196.

- Trevezio RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA** (1995). Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457–1463.
- Turner LH** (1969). Leptospirosis *Br Med J* 1: 231-235.
- Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD** (2003). Associations between leptospirosis in rodents, reservoir and environmental characteristics. *Prev. Vet. Med.*, 60: 227–235.
- Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI y Tarabla HD** (2008). Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Tropica* 107: 255–258.
- Van Belkum A, Sherer S, Van Alphen L y Verbrugh H** (1998). Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbial Mol Biol Rev* 62: 275-293.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology y Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM).** (2007), Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 13: 1-46.
- Varni V, Ruybal P, Lauthier JJ, Tomasini N, Brihuega B, Koval A, y Caimi K** (2014). Reassessment of MLST schemes of *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infect Gen Evol* 22: 216-222.
- Vijayachari P, Hartskeerl RA, Sharma S, Natarajaseenivasan K, Roy S, Terpstra WJ y Sehgal SC** (2004). A unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands: a proposal of serovar portblairi of serogroup Sehgalii. *Epidemiol Infect* 132: 663-673.
- Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC** (1996). Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 125: 794-8.
- Wagenarr JA, Segers, RPAM y van der Zeijst BAM** (1994). Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. *Mol Biotech* 2: 1-14.
- Watt G, Alquiza LM, Padre LP, M. L. Tuazon ML y Laughlin LW** (1988). The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infect Dis* 157: 840–842.
- Weil A** (1886). Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsche. Arch Klin Med* 39: 209-232.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA y Lane DJ** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- Wolff JW** (1954). The laboratory diagnosis of leptospirosis. C. C. Thomas, Springfield, Ill.

- Woodward MJ, Sullivan GJ, Palmer JC, Wooley JC y Redstone JS** (1991). Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype bovis. *Vet Rec* 128: 282-283.
- World Health Organization (WHO)** (1999). Leptospirosis worldwide *Wkly Epidemiol Rec* 74: 237–242.
- Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F y Brenner DJ** (1987) Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol* 37: 407-415.
- Zuerner RL** (2005). Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol* Cap. 12: Un. 12 E.1.
- Zuerner RL y Alt DP** (2009) Variable Nucleotide Tandem-Repeat Analysis Revealing a Unique Group of *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Isolates Associated with California Sea Lions. *J Clin Microbiol* 47: 1202-1205.
- Zuerner RL, Alt D y Bolin CA** (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensulato serovars. *J Clin Microbiol* 33: 3284-3289.
- Zuerner RL y Bolin CA** (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* by IS1500 hybridization and PCR assays. *J Clini Microbiol* 35: 2612-2617.
- Zuerner RL, Ellis WA, Bolin CA y Montgomery JM** (1993a) Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *J Clin Microbiol* 31: 578-583.
- Zuerner RL, Hartskeerl RA, van de Kemp H y Bal AE** (2000). Characterization of the Leptospirosis Interrogans S10-spe-a operon. *FEMS Microbiol Let*, 18: 303-308.
- Zuerner RL, Hermann JL y Girons IS** (1993b). Comparision of genetics maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intra species heterogenecity. *J Bacteriol* 175: 5445-545.