

Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales

Usefulness of molecular tools to identify *Leptospira* spp. in human, animal and environmental samples

MSc. María Catalina Ospina-Pinto,^I MSc. Patricia Hernández Rodríguez^{II}

^I Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

^{II} Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Leptospirosis es una enfermedad zoonótica endémica de potencial epidémico que afecta la salud pública y la producción pecuaria alrededor del mundo. Su agente etiológico es una espiroqueta del género *Leptospira*, con 20 especies reportadas hasta el momento, son las más importantes *Leptospira interrogans* (patógena) y *Leptospirabiflexa* (saprófita). Esta bacteria se transmite mediante contacto directo o indirecto en especial con orinade animales infectados, es la transmisión por medio del agua una de las más importantes. En cuanto al diagnóstico se ha evidenciado que diversas pruebas moleculares tienen una alta especificidad y sensibilidad; sin embargo, el conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis se ha basado principalmente en estudios serológicos que han utilizado la prueba de aglutinación microscópica que presenta debilidades en sus resultados e interpretación. El objetivo del presente artículo es presentar una revisión actualizada sobre la utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. Se llevó a cabo una búsqueda de literatura en diferentes bases de datos como Pubmed, Science Direct, SciELO, Scopus y Redalyc. Las publicaciones encontradas fueron artículos originales y de revisión, entre otros, publicados entre 1965 y 2014. Se determinó que las herramientas moleculares permiten una identificación directa, rápida, definitiva y precisa del agente etiológico, apoyan el diagnóstico, aportan al conocimiento real de la prevalencia e incidencia de la enfermedad. Las herramientas moleculares permiten la identificación de nuevas especies a partir de aislamientos obtenidos de diversas fuentes y ayudan a orientar los programas de prevención y control de esta zoonosis.

Palabras clave: *Biología molecular, Leptospira, aislamientos locales, ambiente.*

ABSTRACT

Leptospirosis is an endemic and potentially epidemic zoonosis affecting public health and livestock production worldwide. Its etiological agent is a spirochaete of the genus *Leptospira*, with 20 species reported to date, of which *Leptospira interrogans* (pathogenic) and *Leptospira biflexa* (saprophyte) are the most important. This bacterium is transmitted by direct or indirect contact with urine from infected animals, so water is one of the major transmission ways. Regarding diagnosis, many molecular tests have been evinced to have high specificity and sensitivity; however, knowledge on the epidemiology of leptospirosis has been based mainly on serological studies using the microscopic agglutination test, which has weaknesses in its results and interpretation. The aim of this article is to present an update review on the usefulness of molecular tools in the identification of *Leptospira* spp. in human, animal and environmental samples. A literature search was conducted in different databases such as PubMed, ScienceDirect, SciELO, Scopus and Redalyc. The publications found were original and review articles, among others, published between 1965 and 2014. It was found that the molecular tools allow direct, quick, definitive and precise identification of the etiologic agent, support the diagnosis, and contribute to real knowledge on the disease prevalence and incidence. Molecular tools enable the identification of new species isolates obtained from various sources and help guide prevention programs and control of this zoonosis.

Keywords: molecular biology, *Leptospira*, local isolates, environment.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular para la identificación y tipificación de microorganismos permite entender la epidemiología de las enfermedades, y precisa el diagnóstico por la especificidad y sensibilidad que estas reportan. Leptospirosis al ser una patología con múltiples huéspedes y reservorios de *Leptospira*, su agente etiológico, se constituye en una enfermedad zoonótica importante, que tiene mayor presentación en países tropicales y subtropicales.¹

Esta enfermedad se considera tanto rural como urbana, afecta en lo principal a poblaciones vulnerables que viven en zonas con malas condiciones sanitarias, sin acceso al agua potable, y con infestación por roedores. Estos factores se asocian con la pobreza en países de bajos y medianos ingresos, por el contrario, en países con altos ingresos la presencia de la enfermedad se asocia con actividades recreacionales alrededor de la fauna silvestre, o con el turismo en lugares remotos donde se practican deportes acuáticos, o se tiene contacto con agua o suelos húmedos. En lo adicional, el impacto de esta enfermedad en humanos es devastador, debido a que puede haber pérdida de tiempo de trabajo y se puede requerir hospitalización, así como es una carga para los sistemas de salud de los países y causa trastornos económicos y sociales.²

Por otro lado, en humanos la leptospirosis es reconocida como una enfermedad ocupacional, que afecta a determinados grupos en riesgo como trabajadores de arrozales y otros productos agrícolas, de minería, de ambientes infectados como los que realizan mantenimiento de alcantarillas y soldados, pero principal, personas que trabajan con animales, ya sean operarios de granjas, mataderos, procesadores de productos y veterinarios; donde el contacto entre humanos y animales que son reservorios potenciales y su hábitat incrementa el riesgo de adquirir la patología. Además, el aumento de la población e invasión de los hábitats de animales silvestres incrementa las oportunidades de interacción y por lo tanto, la transmisión de este patógeno en la interfaz humano-animal-ambiente.³

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad puede representar hasta el 20 % de las patologías febriles de origen desconocido, tiene una incidencia media anual global endémica de 5 por cada 100,000 habitantes, lo cual puede variar en dependencia de la región, debido a que en algunas áreas puede llegar a 975, un aproximado de 17 % de las personas hospitalizadas por leptospirosis sufren daño pulmonar agudo y de estas el 25 % mueren. Asimismo, en el caso de las Américas, la incidencia es de 12,5 por cada 100,000 habitantes, y en Colombia de 3,05 casos por cada 100,000 habitantes; por lo tanto es importante diferenciarla de otras patologías que son endémicas en países tropicales, debido a que por la variedad de signos clínicos que presenta, se confunde fácil, con otras como influenza y fiebres hemorrágicas virales.⁴

Para el diagnóstico de leptospirosis, la prueba de microaglutinación (MAT) es la técnica de referencia internacional. Sin embargo, este test es dispendioso, necesita una colección de cepas para ser utilizadas como antígenos, la interpretación de los resultados es complicada por las frecuentes reacciones cruzadas entre los serogrupos y por la determinación del punto de corte que depende de la endemidad de la región. Su sensibilidad, varía entre 40 y 89,2 %, y su especificidad entre 85,97 y 100 %, la cual depende del panel de serovares utilizados y de si en este se tienen cepas locales.⁵⁻⁹

Por todo esto, se evidencia la importancia de abordar esta enfermedad desde el concepto de Una Salud, en el que las profesiones médicas y veterinarias colaboran en beneficio mutuo, se tiene en cuenta que poseen diferentes funciones pero tienen un interés común respecto a muchas enfermedades y comparten muchos desafíos. Además, las acciones se deben realizar no sólo a nivel local y nacional sino también a escala global, mejorar la investigación, intensificar las medidas de prevención y en países en desarrollo, llevar a cabo un control integral a largo plazo de enfermedades zoonóticas endémicas como leptospirosis.¹⁰

El uso de diferentes métodos moleculares es una herramienta importante para proporcionar un diagnóstico preciso de la enfermedad, e identificar aislamientos que permitan caracterizar la diversidad de cepas en diferentes huéspedes, en el ambiente y en diferentes regiones geográficas; aportara la epidemiología de la enfermedad, a la relación humano-animal-ambiente y al desarrollo de programas de prevención y control de la enfermedad.^{6,11,12} Por esto, el objetivo de este artículo es presentar una revisión actualizada sobre la utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales.

MÉTODOS

Para la revisión se realizó una búsqueda bibliográfica entre 1965 a 2014 en bases de datos como Pubmed, Science Direct, SciELO, Scopus y Redalyc. Para esta, se utilizaron palabras clave en español e inglés relacionadas con la temática como *Leptospira*, leptospirosis, biología molecular, aislamientos y ambiente. Una vez seleccionados los artículos a incluir en la revisión se realizó una lectura y análisis crítico de la información que se utilizó para la construcción de los temas que argumentan la utilidad de las herramientas moleculares en la identificación de *Leptospira* en muestras humanas, animales y ambientales

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Leptospirosis: generalidades, agente etiológico y epidemiología

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica que afecta al hombre y a los animales, tanto domésticos como silvestres, que a su vez son fuente de infección para los humanos. Tiene impacto económico y en la salud en muchas regiones del mundo, pero a pesar del aumento en el número de casos y focos, se mantiene como una enfermedad desatendida, por lo que se ha convertido en una amenaza para la salud pública.²

El agente etiológico es una espiroqueta aerobia obligada del género *Leptospira*, orden *Spirochaetales* y de la familia *Leptospiraceae*, es una bacteria de forma helicoidal, delgada, con una longitud de 6 a 20 μm , un diámetro de 0,15 a 0,3 μm y con gran movilidad por el endoflagelo que posee. A diferencia de otras bacterias, el lipopolisacárido (LPS) constituye el principal antígeno de *Leptospira*, y presenta una menor actividad endotóxica, de hasta 12 veces menor letalidad en ratones en comparación con el LPS de *Escherichia coli*. Posibles, por las propiedades únicas del Lípido A de *Leptospira*, entre estas, una unidad de disacárido de glucosaminamodificada que es fosforilada y metilada.¹³ Además, el LPS de *Leptospira* tiene una composición química similar a la mayoría de LPS de bacterias Gram negativas, excepto por la ausencia de ácido hidroximíristico, un marcador común del grupo de LPS entéricos, y de ácido 2-Ceto-3-deoxyoctónico.¹⁴ La membrana externa está conformada por lipoproteínas específicas como LipL21 y LipL41, por proteínas integrales de membrana como OmpL1 y por el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) secretina GspD.¹³ A esta membrana externa están asociadas tres capas de densidad distintas, por lo cual es considerable más gruesa que la de *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*.^{15,16}

El tamaño del genoma de *Leptospira* varía en dependencia de la especie, el de *L. interrogans* es de 4627 kb, el de *L. borgpetersenii* de 3931 y el de *L. biflexa* de 3956; a pesar de estas variaciones las especies comparten 2052 genes. Existen 20 especies de *Leptospira* que según su patogenicidad se clasifican en tres grupos: 9 patógenas; 6 saprófitas; 5 intermedias¹⁷. Dentro de una misma especie, pueden encontrarse serovares patógenos y saprófitos, y dentro de estos heterogeneidad genética entre las múltiples cepas. Además, ni el serogrupo ni el serovar pueden predecir la especie de *Leptospira*, y aunque los serogrupos no tienen una posición taxonómica son muy útiles desde el punto de vista epidemiológico. Por esto, es importante realizar los dos tipos de clasificación, molecular y serológica, para entender la epidemiología de la enfermedad.¹⁸

Importancia de la leptospirosis en salud pública

Para determinar el verdadero impacto de la enfermedad, se deben mejorar los sistemas de vigilancia y el diagnóstico en todo el mundo, disminuir así el sub-registro, y permitir conocer la distribución geográfica, la presencia de nuevos reservorios y en lo principal la verdadera incidencia de la enfermedad. Igual, al mejorar los sistemas de diagnóstico se pueden evaluar las intervenciones y estrategias de control y determinar las pérdidas económicas en humanos, por incapacidad de individuos en edad productiva y los costos de tratamiento, y en animales por alteración en los parámetros productivos y reproductivos.¹⁹

Se estima que 1700,000 personas que tienen esta enfermedad padecen la forma severa, y que hay más de 500,000 casos de leptospirosis cada año en el mundo, encontrándose por encima de otras enfermedades relevantes como la hantaviriosis severa y el dengue hemorrágico. En conjunto, más de 1, 000 000 000 de personas en el mundo viven en asentamientos irregulares, donde la probabilidad de exposición es más alta, están marginalizados y no tienen acceso a los servicios médicos básicos.¹⁹

Otro factor importante para la presencia de la enfermedad es el mecanismo de transmisión que puede ser directo o indirecto; el primero se relaciona, máxime por contacto con orina, y otros fluidos corporales como descargas uterinas, semen, leche, fluidos fetales y placentarios, y por vía transplacentaria. En el segundo mecanismo el contacto indirecto con suelo, agua, y alimentos contaminados, permite la entrada de la bacteria por mucosas, piel húmeda intacta o con lesiones, ingestión o inhalación de gotas o aerosoles de fluidos contaminados con orina de animales infectados, incluso se han reportado casos por mordedura de animales, y la transmisión entre humanos se ha documentado pero es muy rara.²⁰

En este sentido es importante estudiar reservorios y factores que puedan servir como vehículo de transmisión, es el agua un factor potencial en este proceso. Por lo tanto, estudiar diferentes fuentes de contaminación se hace necesario en muchas partes del mundo donde las condiciones ambientales favorecen la diseminación y presencia de la bacteria aumentando los casos de leptospirosis en humanos y animales.²¹

Los mecanismos por los que la bacteria ocasiona daño y produce la enfermedad en el huésped no están bien definidos, en lo específico la base molecular de la virulencia es desconocida por la falta de herramientas moleculares para su estudio. A pesar de que existen reportes de mecanismos de patogenicidad, los componentes específicos responsables de la patogénesis no han sido de total identificación. Por esto también, es importante estudiar los procesos moleculares asociados con la infección y aún más cuando se ha identificado que la infección varía, acatado del serovar.¹³

***Leptospira* spp. en humanos, porcinos, roedores y agua**

Por la similitud con otras patologías, como el dengue e incluso la fiebre chikungunya, con frecuencia la leptospirosis en humanos es mal diagnosticada, aunque en lo general la infección es subclínica o leve; los síntomas aparecen de forma abrupta de 2 a 20 días después del ingreso de *Leptospira* al organismo y duran de 6 días a más de un mes. Presenta, por lo común fiebre, fotofobia, tos, diarrea, dolor abdominal, mialgias y dolor de cabeza, entre otros; y luego de la resolución de estos, dos o tres días después reaparecen y se produce la fase inmune que se caracteriza por aumento de los títulos de anticuerpos e infiltración inflamatoria de los órganos afectados.²²

Alrededor del 10% de los pacientes desarrollan la forma severa de la enfermedad conocida como síndrome de *Weil*, que cursa con ictericia intensa, falla renal y hemorragia pulmonar, es el serovar *Icterohaemorrhagiae* el principal responsable. La infección inicia con un cuadro similar a la leptospirosis leve, y más o menos una semana después se desarrollan las manifestaciones graves, como insuficiencia renal avanzada con anuria, afección pulmonar con tos, disnea, dolor torácico y hemoptisis por las hemorragias parenquimatosas pulmonares. También se puede presentar hemorragia digestiva y subaracnoidea, hemólisis, miocarditis, colecistitis, pancreatitis, síndrome de distrés respiratorio, coagulación intravascular diseminada, shock y falla multiorgánica.²¹

En la especie porcina, la infección más frecuente es la subclínica, que es donde única tiene evidencia serológica pero no con signos clínicos, o estos son inaparentes, debido a que la infección es endémica en las granjas porcinas, y se encuentra en hembras vacías y no lactantes, y en animales en etapa de crecimiento, en donde el animal es expuesto a la bacteria y manifiesta un nivel de anticuerpos contra ésta, pero ningún signo de enfermedad y por lo tanto estos animales, aparente sanos se convierten en portadores de la bacteria y la eliminan al ambiente, propagándola, y es fuente de infección para otros animales.²³

Por otro parte, dos grupos de porcinos son más propensos a desarrollar la infección clínica, las hembras preñadas y los lechones. La infección aguda coincide con el periodo de leptospiremia y sus signos clínicos principales son fiebre, anorexia y decaimiento, pero se puede presentar diarrea, ictericia y hemoglobinuria. En la forma reproductiva o crónica, las hembras reproductoras pueden manifestar agalactia, fiebre y anorexia, pero se caracteriza por la presentación de abortos, nacimiento de lechones débiles, mortalidad neonatal, y lechones nacidos muertos, y por lo tanto puede causar grandes pérdidas económicas para los productores.²⁴

En el caso de los roedores, que son el principal reservorio de *Leptospira*, se presenta una relación comensal con el microorganismo, el cual se mantiene viable, se multiplica y elimina durante toda su vida, y pueden transferirlo a sus crías en el periodo neonatal o a través, de la placenta. Los roedores de los géneros *Rattus*, *Mus* y *Apodemus* son fuente de infección natural de *Leptospira* porque contaminan el ambiente, los alimentos y el agua a través de su orina; ponen en riesgo la salud humana y animal, en especial, en regiones cercanas a cuerpos de agua, por lo que el control integral de estas especies plaga, es fundamental para la prevención de la enfermedad.^{25,26}

La transmisión de *Leptospira* por medio del agua es una de las más importantes y frecuentes, debido a que la contaminación de fuentes hídricas ha resultado en brotes severos de leptospirosis y en presentación de casos asociados con actividades recreacionales. Sin embargo, no todos los tipos de agua son favorables para la supervivencia de la bacteria debido a que el microorganismo se ve afectado por la salinidad, el pH y la temperatura, que si es baja disminuye la multiplicación del agente pero aumenta su tiempo de supervivencia y por el contrario, si es alta favorece la multiplicación pero disminuye el tiempo de supervivencia; el cual puede ser hasta de 180 días y mantener su capacidad infectante por 22 días.²⁷

Se han realizado aislamientos de *Leptospira* a partir de muestras de agua de ríos o arroyos, es crucial su análisis debido a que estas fuentes hídricas son utilizadas para el consumo en poblaciones humanas y animales. Se ha demostrado que *L. interrogans* tiene una capacidad de supervivencia en agua con concentraciones mínimas de nutrientes, y tiene similitudes considerables en cuanto a la presencia de genes involucrados en esta supervivencia y en los mecanismos de transducción de señales con *L. biflexa*. Aunque en el agua existe una mayor tasa de crecimiento de especies saprófitas con respecto a las patógenas, es importante identificar las especies predominantes, lo cual no es posible mediante el cultivo pero si a través de pruebas moleculares que permitan diferenciarlas, conocer especies nativas o nuevas para cada región y establecer las especies circulantes frente a situaciones ambientales que favorezcan la presencia de la bacteria.²⁸

Métodos diagnósticos convencionales

En la prueba aglutinación microscópica (MAT) se enfrentan antígenos vivos que representan los diferentes serogrupos con los sueros, y se evalúa el grado de aglutinación por medio de microscopía de campo oscuro. Para la realización de la prueba se deben mantener paneles de leptospirosas vivas, que incluye como mínimo, todos los serovares circulantes locales o serovares representativos de todos los serogrupos, presentándose falsos negativos si el panel está incompleto. Para la confirmación se requiere un aumento de cuatro veces o más entre dos muestras de sueros pareados con dos semanas de diferencia, e identifica el serogrupo presuntivo. Por otra parte, esta prueba puede ser positiva desde el día 10, después de la aparición de los síntomas y se ha reportado que tiene una sensibilidad de 41% durante la primera semana, de 82% de la segunda a la cuarta y de 96% a partir de la quinta semana de presentar la enfermedad.²⁹

La prueba de MAT consiste en incubar una serie de diluciones del suero con varias cepas de *Leptospira*, y se considera positiva para el antígeno probado y para cierta dilución cuando al menos el 50% de las leptospirosas están aglutinadas en comparación con un antígeno control con el suero; esta técnica es subjetiva, costosa y difícil de implementar, requiere experticia para su realización e interpretación, y la cinética de los anticuerpos varía de un individuo a otro, tiene limitaciones como indicador epidemiológico, carece de precisión, y no siempre hay correlación entre los serogrupos identificados y los obtenidos por identificación después del aislamiento. Además, es importante tener en cuenta que los datos cronológicos del muestreo, la aparición de síntomas clínicos, la vacunación y el uso de terapias antibióticas pueden alterar los resultados.¹⁷

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), es otra prueba serológica que se basa en la detección de anticuerpos IgM, y puede proporcionar el diagnóstico de leptospirosis con una sola muestra de suero durante la fase aguda de la enfermedad con síntomas de leptospirosis, aunque se requiere tomar una muestra dos semanas después para confirmar los resultados. Los anticuerpos IgM en leptospirosis persisten por un largo periodo con varias tasas de disminución y la concentración de bacterias es menor en suero que sangre fresca, por lo tanto ELISA tiene aplicabilidad como prueba rápida para el diagnóstico de leptospirosis en situaciones donde los recursos son limitados y en centros de salud y laboratorios donde no está disponible la prueba de MAT.²²

El aislamiento de *Leptospira* es muy complejo, debido a que depende de la etapa de la enfermedad en que se encuentre el individuo, en el caso del cultivo a partir de muestras de sangre se debe realizar lo más pronto posible después de la aparición de los síntomas, se inoculan una o dos gotas de sangre en medio EMJH semisólido con antibiótico, y en lo posible realizar varios cultivos o inocular con diluciones de muestras de sangre. Otras muestras que pueden ser cultivadas son el dializado peritoneal y en el líquido cefalorraquídeo, durante la primera semana de la enfermedad, y la orina, desde la segunda semana, aunque la duración de la excreción por medio de esta varía, pero puede durar de semanas a meses.³⁰

La identificación de los aislamientos es importante porque por medio del cultivo no es posible saber a qué serogrupo, serovar o cepa corresponde, por esto depende de la clasificación a la que se quiera llegar, se pueden realizar diversos métodos serológicos como la aglutinación absorbida, anticuerpos monoclonales o la prueba de MAT, pero por las dificultades en la identificación serológica debido a que pocos laboratorios tienen una colección completa de los serovares, se utilizan las técnicas moleculares para la identificación y subtipificación de *Leptospira*.³¹

Herramientas moleculares

La necesidad de tener un diagnóstico rápido y directo ha llevado al desarrollo de numerosos ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuya ventaja es la obtención de un diagnóstico definitivo, sensible y específico, desde la fase aguda a la convaleciente de la enfermedad e incluso antes de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas convencionales. Estos ensayos se basan en la identificación de genes presentes en *Leptospira* como *rrs*, *secY*, *lipL32*, *ligB2*, *ligA*, entre otros, que a partir de la amplificación de pequeñas cantidades de ADN pueden servir como marcadores moleculares de infección.⁸⁴ Sin embargo, la selección de la prueba de laboratorio apropiada depende de la prevalencia, de la etapa de la enfermedad, de la infraestructura de los laboratorios y de la disponibilidad de pruebas específicas, entre otros factores. La [tabla](#) muestra una comparación entre los métodos diagnósticos moleculares y convencionales que pueden ser utilizados en diferentes fases de la enfermedad.²⁹

Tabla. Comparación pruebas diagnósticas comunes para leptospirosis

	Cultivo	MAT	ELISA	IgM prueba rápida	Pruebas moleculares
Muestras	Sangre, orina, LCR, tejidos	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre, orina, LCR, tejidos
Ventana de positividad	1 ^{ra} semana: Sangre y LCR Tiempo leptospiuria: Orina	Día 10 a 12	Día 6 a 8	De día 6 a 8	Día 5 a 10: Sangre y LCR Tiempo leptospiuria: Orina
Tiempo de procesamiento	2 semanas a 4 meses	Varias semanas si no está disponible localmente	1 día	15 - 30 minutos	1 día
Diagnóstico temprano	No	No	No	No	Si
Diagnóstico definitivo	Si	No	No	No	Si
Identificación - Especies - Serogrupos - Serovares	No No No	No Si No	No No No	No No No	Si Si Si

El ADN de *Leptospira* se amplifica a partir de suero, orina, humor acuoso, LCR y un gran número de tejidos como riñón e hígado, utiliza pares de iniciadores para todas las especies patógenas y saprófitas, de los que se han descrito un gran número, algunos basados en genes blanco específicos como 16s o 23s ARNr, o *lip132* que sirve para diferenciar especies patógenas de saprófitas.³² Un limitante de la PCR convencional y la PCR en tiempo real (qPCR) es la inhabilidad para identificar el serovar infectante, lo cual no tiene mucha importancia para el manejo de un paciente individual pero si tiene un valor epidemiológico y para la salud pública significativo, porque puede indicar la fuente de infección y los reservorios, y así llevar a cabo métodos de prevención y control adecuados. En este sentido, la electroforesis de campo pulsado (PFGE) permite la identificación de serovares de *Leptospira*.^{18,33}

Entre las variantes de PCR se encuentra la qPCR que combina la amplificación y detección del producto amplificado en la misma reacción, con excelente sensibilidad y especificidad, hasta del 100% y con bajo riesgo de contaminación, por lo que en la actualidad se utiliza como técnica de rutina para la diferenciación entre especies patógenas y saprófitas por medio de los genes 16sARNr y *lip132*, y aunque la herramienta es algo costosa, es costo-efectiva, los diferentes ensayos proporcionan un diagnóstico temprano y rápido, y es ideal para usar con muestras de campo que pueden estar contaminadas, lo cual sería un problema al realizar el cultivo.³² En un estudio realizado con qPCR se detectaron hasta 10² leptospiras/mL en suero, plasma y sangre completa, y se obtuvieron 26 diagnósticos positivos de 85 pacientes antes que la prueba de MAT, sin ningún falso positivo y con una sola muestra obtenida en la fase aguda de la enfermedad.³⁴

Para identificar las especies de *Leptospira*, la PCR anidada realiza dos procesos de amplificación con distintos pares de iniciadores, unos externos que amplifican una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana y otros internos que con el producto de la primera amplifican la región específica, por lo que se incrementa la sensibilidad y especificidad de la detección por la obtención de productos de PCR más cortos. El gen ribosomal *rrs* (16s ARNr) varía entre especies por algunos pares de bases y permite diferenciar especies de *Leptospira*. En un estudio identificaron 110 cultivos y 36 muestras de sangre, en donde 44 muestras correspondían a *L. interrogans*, 36 a *L. kirschneri*, 38 a *L. borgpetersenii*, 3 a *L. noguchii*, 22 a *L. santarosai*, 2 a *L. kmetyi* y una última muestra a una variante de *L. kmetyi* o *L. kirschneri*.¹²

La técnica molecular de referencia para la genotipificación de cepas de *Leptospira* es la PFGE, que utiliza una enzima de restricción que fragmenta el genoma de la bacteria, separa estos fragmentos en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico donde estos migran según su tamaño, se obtiene unos patrones de banda que se clasifican como pulsotipos según una similaridad de más del 80%. En la caracterización molecular de 20 aislamientos de roedores, caninos y humanos, todos pertenecieron a un solo pulsotipo con una similaridad genética del 88 al 100% con el control *L. interrogans* serovar Copenhageni/Icterohaemorrhagiae, los cuales no se pueden distinguir por esta técnica, debido a que estos serovares han sido considerados similares genética y serológicamente, pero si demuestra la posible transmisión de estos serovares entre las especies de hospederos.³⁵

Estas técnicas moleculares también se han utilizado para la tipificación y caracterización de otros microorganismos, en especial la PFGE, que por su alto poder discriminatorio y reproducibilidad, es utilizada para realizar estudios de epidemiología molecular de otras bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. y *Vibrio cholerae*, debido a que es útil en el reconocimiento de brotes de infección, detecta transmisiones cruzadas, puede identificar fuentes de infección, reconoce cepas virulentas e igual, es una herramienta valiosa para realizar el seguimiento de programas de vacunación y determinar similitudes genéticas entre aislamientos, permite inferir si dos aislamientos aparente no relacionados tienen la misma procedencia.³⁶

En el análisis de repeticiones en tándem de número variable en locus múltiples (MLVA) se cuenta el número de alelos repetidos en el genoma para una serie de locus conservados que son amplificados por PCR. En 22 cepas de *Leptospira* patógena aisladas de roedores se encontraron seis perfiles de MLVA, identificados como *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni/Icterohaemorrhagiae y serogrupo Canicola serovar Portlandvere, y *L. borgpeterseni* serovar Castellonis, se demostró que el mismo genotipo puede ser compartido por algunas cepas, que también fueron caracterizadas, se usó la prueba de aglutinación absorción, se generó los mismos resultados que la tipificación por MLVA, y además estos patrones se aislaron con antelación de cerdos, humanos, agua de río, bovinos y otros roedores.³⁷

El análisis de secuencias de locus múltiples (MLST) se ha convertido en el método molecular de elección, que amplifica y secuencia fragmentos del genoma de genes "housekeeping". Al realizar una aplicación del perfil alélico para la inferencia de serogrupos, por la falta de correlación genética de la clasificación de *Leptospira* con MAT, se encontró que sólo 4 de 96 tipos de secuencias (TS) eran representadas por más de un aislamiento, identificadas con los serogrupos Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Sejroe y Australis, por lo que la posibilidad de inferir el serogrupo por una técnica genética como el MLST puede proveer una alternativa a los métodos serológicos que no están siempre disponibles y presentan discrepancias, es exitosa para proveer un alto grado de discriminación entre especies, y la correlación observada entre TS y serogrupos soporta la implementación de MLST como un enfoque complementario para contribuir a la clasificación de cepas de *Leptospira*.³⁸

Se debe realizar una identificación definitiva de los aislamientos porque así se pueden identificar nuevos serovares de Leptospira; esto debido a que cepas indistinguibles por genética pueden tener un perfil serológico similar y cepas con genética similar pueden ser diferentes por serología. En este sentido, a partir de la cepa RIM 139 se identificó el nuevo serovar Altodouro, del serogrupo Pomona de L. kirschneri encontrada en un Mus musculus, que mediante microscopía de campo oscuro mostró motilidad y morfología típicas de Leptospira, fue patogénica en hámsteres. Se determinó la especie mediante PCR con primers específicos y por secuenciación del gen secY y ompL1, se identificó el serogrupo presuntivo por medio de MAT, mediante anticuerpos monoclonales (mAbs) y aglutinación absorción (CAAT), no reaccionó con ninguna cepa referencia, y a través de análisis de restricción de endonucleasas (REA) se confirmó la nueva naturaleza de la cepa, que mostró que se trataba de un nuevo serovar.³⁹⁻⁴¹

Prevención y control de leptospirosis

El nivel de prevención primaria es el más importante y debe estar basado en el conocimiento de los grupos que están en riesgo particular de infección y en las necesidades locales. La primera estrategia se fundamenta en la promoción de la salud, con métodos educativos, los cuales deben estar dirigidos tanto a la comunidad en general, como a los médicos humanos y veterinarios, para disminuir el riesgo y el impacto de la enfermedad a través, de diferentes estrategias como material impreso, internet, televisión, seminarios y líneas telefónicas directas, por lo tanto, los profesionales de la salud deben aprender a identificar los casos de forma temprana, el diagnóstico, el manejo y el tratamiento. Para la protección específica, la desinfección de instalaciones y de áreas pequeñas es posible debido a que *Leptospira* es sensible a varios desinfectantes y a la desecación, y el control integral de roedores juega un papel fundamental en la prevención directa del desarrollo de la enfermedad por la eliminación de la fuente de infección.⁴²

La inmunización por medio de vacunas, basadas en suspensiones de leptospirosis muertas, es limitada en animales y humanos y sólo está disponible en algunos países. Además, se induce una inmunidad de corta duración que nunca es del 100% debido a que esta es serovar específica. Con la vacunación se reduce de forma significativa la prevalencia de la infección, se disminuye la presentación de manifestaciones clínicas pero no se elimina por completo la bacteria y continúa su expulsión por la orina, propicia la diseminación. Para una adecuada inmunización, se debería realizar un perfil serológico y tipificación molecular para determinar las serovariedades circulantes y así seleccionar la vacuna que se debe utilizar, e identificar los aislamientos locales para incluirlos en esta. Es de señalar que como los serovares y cepas de *Leptospira* varían entre los países, puede que las vacunas producidas en un país, en particular no sean eficaces en otro, e incluso no lo sean en los países de origen porque no incluyen aislamientos locales.⁴²⁻⁴⁴ Otro enfoque en el diseño de vacunas, es la búsqueda de proteínas comunes presentes exclusivo en especies patógenas que puedan generar inmunoprotección frente a los serovares asociados con la enfermedad.^{32,45,46}

Para una completa quimioprofilaxis en combinación con la vacuna, se pueden utilizar antibióticos como la penicilina, la amoxicilina, la doxiciclina, la ampicilina o la estreptomina, entre otros, que son eficaces contra *Leptospira* y son utilizados en el tratamiento de la enfermedad en los primeros 5 días, luego de la aparición de los signos y síntomas, y sin esperar la confirmación por laboratorio. En cuanto al manejo clínico en humanos, este incluye terapia de soporte, con hidratación, control de signos vitales y administración de analgésicos, e incluso diálisis y tratamientos más específicos para manifestaciones severas de la enfermedad como insuficiencia renal y sintomatologías neurológicas.⁴²

La prevención secundaria, se lleva a cabo mediante encuestas, monitoreo y vigilancia epidemiológica, se realizan pruebas de tamizaje en poblaciones sospechosas, se utilizan métodos diagnósticos como PCR sensibles y específicos en enfermos, se implementa un tratamiento apropiado para prevenir secuelas o incapacidad como daño renal o hepático y la muerte. La prevención terciaria se realiza si los niveles primarios y secundarios fracasan por lo que el punto clave es la rehabilitación y recuperación integral del individuo, mediante asistencia y terapias específicas, se tiene en cuenta la parte física, psicológica y social.⁴⁷

El control debe realizarse en conjunto por parte de las entidades de salud pública y de sanidad animal, e incluye estrategias como la notificación inmediata del caso a la autoridad sanitaria más cercana que a la postre notificara a la autoridad regional, la investigación de las probables fuentes de infección, difundir la información a la población en riesgo, y la implementación de medidas como antibioticoterapia, el diagnóstico serológico y la vacunación. Además, la realización de obras para la comunidad como la construcción de desagües y suministrar servicio de agua potable; así como, la gestión integral de plagas enfocada al saneamiento básico y a la adecuación de instalaciones que limiten el acceso al agua, refugio y alimentos con el fin de reducir la población de roedores.^{48,49}

Los sistemas diagnósticos, la prevención y el control, requieren del trabajo interdisciplinar cuya integración es uno de los pilares que fundamenta el concepto de Una Salud, cuyos programas incluyen mejorar capacidades como la detección temprana de enfermedades, el diagnóstico basado en laboratorio, predecir focos en la interface humano-animal-ambiente, mejorar la vigilancia epidemiológica, identificar nuevos patógenos en animales silvestres, y educar a los profesionales de disciplinas relacionadas con este concepto, a estudiantes que se desean formar en esta área, en universidades, e incluso desde el colegio, y al público en general, debido a que es una temática que le concierne a toda la sociedad.^{10,50}

La utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales es muy amplia y abarca muchos aspectos que deben ser estudiados para entender la epidemiología de la leptospirosis. El uso de estos métodos proporciona un diagnóstico rápido y preciso, y estas pruebas son sensibles y específicas, aunque pueden ser dispendiosas en relación con los métodos convencionales. Sin embargo, estos tienen muchas debilidades en sus resultados e interpretación; por lo tanto, se justifica el uso de las pruebas moleculares al hacer la relación costo/beneficio.

Las pruebas moleculares identifican aislamientos, permiten conocer las especies circulantes, los serogrupos y serovares de cada región, la diversidad de cepas en diferentes huéspedes y en el ambiente e incluso la identificación de nuevos serovares y portadores; todos estos aspectos aportan elementos que mejoran el diseño y la eficacia de las vacunas; así como, el desarrollo de programas de prevención y control de leptospirosis. Además, para establecer si existe relación epidemiológica entre las diferentes especies animales, ambiente y humanos, *es importante* realizar estudios de epidemiología molecular por la poca correlación que existe entre la clasificación serológica y genotípica, como se ha realizado también con otras bacterias patógenas como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp., entre otras, y demostrar la evolución en la clasificación y en el diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jobbins SE, Sanderson CE, Alexander KA. *Leptospira interrogans* at the Human–Wildlife Interface in Northern Botswana: A Newly Identified Public Health Threat. *Zoonoses and Public Health*. 2013;61(2):113-23.
2. Schneider M, Jancloes M, Buss D, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, et al. Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10:7229-34.
3. Guerra M. Leptospirosis: Public health perspectives. *Biologicals*. 2013;41:295-7.
4. World Health Organization-WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland. 2011:1-34.
5. Hernández Rodríguez P, Quintero G, Díaz C, Dalmau E. Comparación del cultivo microbiológico y visualización por campo oscuro para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos de la Sabana de Bogotá. *Revista de Investigación, Universidad de La Salle*. 2008;8(1):9-15.
6. Hernández Rodríguez P, Díaz C, Dalmau E, Quintero G. A comparison between Polymerase Chain Reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of Leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods, Elsevier*. 2011;84:1-7.
7. Moreno N, Agudelo Flórez P. Aplicación de las Pruebas de PCR Convencional Simple y Múltiple para la Identificación de Aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2010;27(4):548-56.
8. Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* Identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*. 2010;10(325):1-11.
9. Salaun L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(11):3954-62.
10. Gibbs P. One Health. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Veterinary Record*. 2014;25:85-92.
11. Ahmed N, Manjulata-Devi S, Valverde M de los A, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006;5(28):1-10.
12. Bourhy P, Herrmann-Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, et al. Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(3):1-10.
13. Adler B, De la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 2010;140:287-96.

14. Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and Chemical Composition of Lipopolysaccharide Extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *Journal of General Microbiology*. 1986;132:103-9.
15. Raddi G, Morado D, Yan K, Haake D, Yang X, Liu J, et al. Three-Dimensional Structures of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(6):1299-1306.
16. Slamti L, De Pedro M, Guichet E, Picardeau M. Deciphering Morphological Determinants of the Helix-Shaped *Leptospira*. *Journal of Bacteriology*; 2011 Nov. p. 6266-75.
17. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*. 2013;43:1-9.
18. Levett P. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(2):296-326.
19. OMS - Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana. Guía para el diagnóstico, vigilancia y control*; 2008.
20. Verdasquera D, Ortega L, Fernández C, Obregón A, Rodríguez I, Miyar R, et al. Enfrentamiento a brotes epidémicos de leptospirosis humana. *Revista Panamericana de Infectología*. 2011;13(1):28-35.
21. Roca B. Leptospirosis. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 2006;50(2):3-6.
22. Budihal S, Perwez K. Leptospirosis Diagnosis: Competency of Various Laboratory Tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(1):199-202.
23. Jackson P, Cockcroft P. *Handbook of Pig Medicine*. Primera Edición, Iowa, USA: Editorial Saunders Elsevier Health Sciences; 2007.
24. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G. *Diseases of Swine*. 10th Edition. USA: Wiley-Blackwell; 2012.
25. Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2005;22(4):290-307.
26. Tesic M, Zugic G, Kljajic R, Blagojevic M. Leptospirosis on a pig farm: health and economic significance and creation of eradication program. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*. 2003:1-3.
27. Sandow K, Ramírez W. Leptospirosis. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2005;6(6):1-61.
28. Gutiérrez B. Estandarización de un protocolo de recolección de muestras y PCR en Tiempo Real para la detección e identificación de especies de *Leptospira* patógenas en muestras de agua de río. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de B.Sc. en Biotecnología. Ecuador: Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito; 2013.

29. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2013;46:245-52.
30. Levett P. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2004; 4:435-48.
31. Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE. Leptospirosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008:251-64.
32. Hernández Rodríguez P, Gómez A, Baquero M, Quintero G. Identification of *ompL1* and *lipL32* Genes to Diagnosis of Pathogenic *Leptospira* spp. isolated from Cattle. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2014;4:102-12.
33. RomeroVivas C, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Máttar S, et al. Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomédica*. 2013;33(Supl.1):179-84.
34. González S, Geymonat J, Hernández E, Marqués J, Schelotto F, Varela G. Usefulness of real-time PCR assay targeting *lipL32* gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;7(12):941-5.
35. Miraglia F, Matsuo M, Morais Z, Dellagostin O, Seixas F, Freitas J, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;77:195-9.
36. CardozoBernal A, Ramón L, PoutouPiñales R, CarrascalCamacho A, Zambrano D. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*. 2013;18(2):203-22.
37. Loffler S, Pavan M, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, et al. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp. isolated from rodents in Argentina. Rio de Janeiro: Memórias do *Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;1-5.
38. Varni V, Ruybal P, Lauthier J, Tomasini N, Brihuega B, Koval A, et al. Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;22:216-22.
39. Paiva Cardoso M, Arent Z, Gilmore C, Hartskeerl R, Ellis WA. Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;13:211-7.
40. Chen F, Fan Q, Qiu W, Yin G, Xing Y. Cloning and Analysis of the Sequence of Outer Membrane Protein Gene of a Serovar *Leptospira canicola Interrogans*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*. 2010;6:55-9.
41. Ko A, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews: Microbiology*. 2009;7(10):736-47.

42. World Health Organization-WHO. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003;1-122.
43. Luo D, Xue F, Ojcius DM, Zhao J, Mao Y, Li L, et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. *Vaccine*. 2010;28:243-55.
44. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. *Infection and Immunity*. 2001;69:7550-8.
45. Saukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Leinonen M. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbial Pathogenesis*. 1987;3(4):261-7.
46. Seixas FK, Fernandes CH, Hartwig DD, Conceição FR, Guimarães JA, Dellagostin OA, et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Canadian Journal of Microbiology*. 2007;53(4):472-9.
47. Leavell H, Clark E. Preventive medicine for the doctor in his community-an epidemiologic approach. Tercera Edición. New York: McGraw-Hill; 1965.
48. Gil A, Samartino L. Zoonosis en los Sistemas de Producción Animal de las áreas Urbanas y Periurbanas de América Latina. *Livestock Policy, Discussion Paper No. 2*. Food and Agriculture Organization (FAO). Livestock Information and Policy Branch, AGAL; 2001 Mar.
49. Sanderson MW, Gnad DP. Biosecurity for reproductive diseases. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2002;18:79-98.
50. Narrod C, Zinsstag J, Tiongco M. A one health framework for estimating the economic costs of zoonotic diseases on society. *Ecohealth*. 2012;9(2):150-s62.

Recibido: 18 de febrero de 2015.

Aprobado: 20 de agosto de 2015.

Patricia Hernández Rodríguez. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

Correo electrónico: pfernandez@unisalle.edu.co