

2021

Fase preliminar para el estudio molecular de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia

Sergio Iván Bedoya Mejía
Universidad de La Salle, Bogotá, sbedoya13@unisalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Bedoya Mejía, S. I. (2021). Fase preliminar para el estudio molecular de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/140>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.



Universidad de La Salle

Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas

Fase preliminar para el estudio molecular de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia

ESTUDIANTE

Sergio Iván Bedoya Mejía

Código: 20151113

Universidad de La Salle, Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas, Programa de Biología.

Trabajo de Pregrado.

Directora: Patricia Hernández-Rodríguez., PhD.

Bogotá D.C.

2021



Universidad de La Salle

Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas

Programa de Biología

Fase preliminar para el estudio molecular de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia.

ESTUDIANTE

Sergio Iván Bedoya Mejía

Código: 20151113

Tutora

Patricia Hernández-Rodríguez., PhD.

Universidad de La Salle

Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas

Programa de Biología

Bogotá D.C.

2021

Tabla de contenido

Resumen Palabras-clave.....	4
Introducción.....	5
Materiales y métodos.....	8
Realización de cultivo y selección de cepas de trabajo.....	9
Extracción y cuantificación de ADN de estos cultivos.....	9
Estandarización de PCR gen <i>lipL32</i>	9
Resultados	10
Discusión.....	16
Conclusiones.....	20
Referencias.....	22

Fase preliminar para el estudio molecular de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia

Sergio Bedoya¹ & Patricia Hernández-Rodríguez²

¹Estudiante Programa de Biología, Universidad de La Salle. ²Docente investigadora Programa de Biología, Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

Resumen

Introducción: la leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas del género *Leptospira* spp. que pueden ser saprófitas o patógenas e infectar a mínimo 174 especies animales. En el caso de la leptospirosis no existe un control totalmente efectivo; siendo importante la detección temprana del agente, por lo tanto, se hace necesario mejorar los procedimientos de detección y buscar alternativas para evitar su transmisión. **Objetivo:** realizar un estudio molecular preliminar del gen *lipL32* de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia. **Materiales y Métodos:** 9 cepas de *Leptospira* spp. previamente aisladas de orina de porcinos, y preservadas a -70°C, fueron reactivadas y cultivadas. Se determinó que los cultivos estuvieran libres de contaminantes y se compararon los procesos de extracción de ADN utilizando dos tiempos de incubación. Para la PCR se emplearon 3 formulaciones con el fin de amplificar el gen *lipL32* (423 pb) **Resultados:** se determinó que el tiempo de incubación óptimo fue de 3 horas; aunque, es posible obtener buenos resultados con un tiempo de incubación menor. Con los productos amplificados se determinó, que de las tres formulaciones la que mejor resultado mostró, fue el número 3, con una concentración de cebador de 0,4 µM y un volumen final de 25 µL, que permitió amplificar la banda de 423 pb correspondiente al gen *lipL32*. Estos resultados muestran una reducción en la cantidad de reactivos sin comprometer la calidad de resultado; esto implica, que se optimizan los reactivos incrementando el número de muestras que se pueden analizar con un kit para PCR. **Conclusión:** la optimización de los procesos de extracción y amplificación de ADN permite mejorar la identificación del agente por métodos moleculares, facilitando un diagnóstico temprano para instaurar medidas de control asociadas con los protocolos de bioseguridad en las granjas.

Palabras Clave: *Leptospira* spp, leptospirosis, cuantificación ADN, PCR, gen *lipL32*.

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis causada por bacterias espiroquetas del género *Leptospira* spp, que agrupa diversas especies capaces de infectar diferentes hospederos (Zarantonelli *et al*, 2018). Se considera la enfermedad zoonótica más extendida en el mundo, pues es reportada en todos los continentes con la excepción de la Antártida, tanto en ambientes urbanos como rurales (Suescún *et al*, 2017; Adler *et al*, 2010).

El género *Leptospira* spp. antiguamente se componía de dos especies *L. biflexa* (saprófita) y *L. interrogans* (patógena), pero en la actualidad, diversos estudios genómicos del género han aportado una cantidad diversa de secuencias genéticas para análisis comparativos, estableciendo mínimo 22 especies; de las cuales 11 son patógenas, 4 oportunistas y 7 saprófitas (Vincent *et al*, 2019; Xu *et al*, 2014) y se cuenta con más de 300 serovares (Adler *et al*, 2010). Esta zoonosis afecta a animales silvestres y domésticos, entre los cuales se encuentran principalmente: caballos, vacas, ovejas, perros y porcinos (Calderón *et al*, 2013; Thibeaux *et al*, 2018; Torres Castro *et al*, 2018).

La transmisión de la bacteria puede darse de dos formas; la directa, se caracteriza porque un organismo entra en contacto con fluidos corporales contaminados como semen, leche, orina, sangre, entre otros; la forma indirecta caracterizada por contacto con agua y suelos contaminados con el agente infeccioso, esta es la más común (De Brito *et al*, 2018; Ospina *et al*, 2019; Baquero *et al*, 2010; Vincent *et al*, 2019; Jacobs *et al*, 2015).

Cuando los animales se infectan normalmente se tratan con antibiótico, controlando la mayoría de los síntomas en individuos no crónicos (Thibeaux *et al*, 2018; Fernández *et al*, 2008); sin embargo, la prevención de la enfermedad; se limita a vacunas serovar específicas que son corta duración (Yinghua & Qiang, 2019; Wang *et al*, 2007). Por lo tanto, la mejor forma de evitar la transmisión y propagación de los agentes patógenos, que causan las zoonosis, es controlar los factores de riesgo en las áreas de producción animal. Para evitar la propagación de microorganismos una poderosa herramienta es la bioseguridad, esta se

define como un conjunto de prácticas que permiten prevenir y evitar la introducción de patógenos que pueden ocasionar enfermedades; igualmente, la identificación temprana de los agentes infecciosos es importante para el control (Robertson, 2020).

Uno de los principales focos de infección y transmisión de *Leptospira* spp. son los porcinos, en esta especie productiva, el control de la bacteria es complejo debido a la falta de vacunas con protección a largo plazo y efectivas (Lovera *et al*, 2017). Por lo tanto, en las granjas porcinas es importante controlar los posibles brotes de leptospirosis mediante la implementación de medidas preventivas. De esta manera, al realizar una identificación temprana de la bacteria es posible aislar los porcinos infectados y fortalecer las medidas de bioseguridad que minimicen la transmisión de la bacteria en las granjas, y así reducir los problemas de salud, que ocasionan fallas reproductivas con pérdidas económicas en las unidades de producción. Adicionalmente, al mejorar las medidas de bioseguridad se disminuye el riesgo de transmisión de la bacteria a las poblaciones humanas y animales (Silva *et al*, 2019; Mata-Haro *et al*, 2012).

En este caso, para la detección de leptospiras y/o leptospirosis existen técnicas serológicas y moleculares; sin embargo, cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y desventajas; las serológicas son de bajo costo, pero requieren un largo tiempo antes de obtener resultados y son indirectas; por el contrario, las técnicas moleculares son más rápidas, son directas, pero son considerablemente más costosas (Riediger *et al*, 2017; Nagraik *et al*, 2019; Costa, 2006; Bertasio *et al*, 2020).

La prueba serológica más utilizada para la detección de leptospirosis es el Test de Microaglutinación Microscópica (MAT) que determina títulos de anticuerpos; sin embargo, los resultados de esta prueba pueden ser falsos positivos, también se presentan problemas para identificar infecciones en etapas tempranas o individuos crónicos (Miotto *et al*, 2018; Waggoner *et al*, 2014). Otra técnica serológica para la detección de la enfermedad es el inmunoensayo (ELISA), aunque esta prueba presenta fallas al detectar anticuerpos en

pacientes que han estado libres de la enfermedad durante mucho tiempo y, además para poder obtener un diagnóstico completo es necesario confirmar los sueros positivos con MAT (Loong *et al*, 2018).

La identificación por PCR es una buena opción al poder identificar la presencia del agente de manera rápida, y a un bajo costo (Hernández-Rodríguez *et al*, 2011), pero una falla de este método es la incapacidad de identificar el serovar presente en el organismo infectado; sin embargo, se pueden diseñar secuencias para identificar grupos específicos permitiendo detectar el patógeno en etapas tempranas de la infección (Costa *et al*, 2006).

Para determinar la presencia de leptospiras utilizando la técnica molecular de PCR se han usado diversos genes objetivo como *rrs*, *rrl*, *flab*, *gyrB*, *ompL1*, *lig*, *lipL32*, *lipL21*, *lipL41*, y *secY* (Chandan *et al*, 2018; Hoseinpur *et al*, 2015; Hernández-Rodríguez *et al*, 2014), también se han utilizado proteínas que se expresan durante la etapa de infección como las proteínas Lig A y B (Raghavan *et al*, 2018); sin embargo, el gen *lipL32* es una de las mejores opciones al momento de detectar leptospiras patógenas, debido a que este gen codifica para una lipoproteína que representa el mayor componente de la membrana externa y puede ser un factor de virulencia en las especies patógenas (Chandan *et al*, 2018).

Esta técnica requiere de evaluación continua para mejorar el diagnóstico, por lo tanto, es importante establecer y mejorar los protocolos teniendo en cuenta los equipos y materiales disponibles en cada laboratorio de forma que sea posible aumentar la productividad optimizando tiempos y costos de investigación (Bourhy *et al*, 2011; Guernier *et al*, 2018; Sedlackova *et al*, 2013; Loibl, 2018). Precisar y optimizar estos procedimientos relacionados con el diagnóstico, favorecen la identificación del agente, que ocasiona la leptospirosis una zoonosis que afecta a la salud pública y la industria pecuaria (Mwachui *et al*, 2015; Hernández-Rodríguez *et al*, 2017).

En Colombia un se ha reportado una subconfirmación por laboratorio en diferentes zonas del país, lo que conlleva a reportes de incidencias por cada 100000 habitantes bajas

en los años 2019 de 0,20 y de 0,13 en 2020 (INS, 2020). Además, un 40% de los casos de leptospirosis en humanos son confirmados por laboratorio; sin embargo, el 63,1 % de los casos notificados en 2016 por el Instituto Nacional de Salud (INS) fueron considerados sospechosos, lo que demuestra la importancia de mejorar la efectividad y capacidad de detectar esta enfermedad en diferentes muestras (INS, 2016). Otros autores han evaluado la presencia de patógenos zoonóticos como la *Leptospira* en granjas semi-tecnificadas (Pulido-Villamarín *et al*, 2019); también en la provincia de Camagüey, Cuba Barreto y colaboradores, mostraron una correlación entre los anticuerpos positivos frente a *Leptospira* spp. en los porcinos y humanos (Barreto *et al*, 2020).

Recientemente en Colombia se publicaron dos estudios que muestran las implicaciones en el ciclo de producción porcina; lo que indica la importancia epidemiológica que los porcinos representan como reservorios de la bacteria causante de leptospirosis (Ospina & Hernández-Rodríguez, 2021; Ospina-Pinto *et al*, 2019). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio molecular preliminar del gen *lipL32* de *Leptospira* spp. en porcinos de granjas bioseguras de Cundinamarca, Colombia.

Materiales y métodos

1. Realización de cultivo y selección de cepas de trabajo

Se seleccionaron 10 cepas, congeladas a -70 °C, que fueron reactivadas; para esto se sembraron en medios de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris: (EMJH) siguiendo el protocolo reportado por Hernández-Rodríguez *et al.*, (2011). Estas cepas previamente se habían aislado de orina de porcinos y habían sido tipificadas (Hernández-Rodríguez., 2017; Ospina *et al*, 2019). Las 10 muestras correspondieron a 9 aislamientos de *Leptospira* spp. *Leptospira* spp. serovar Pomona, *Leptospira* spp. serovar Bratislava, *Leptospira* spp. serovar Grippotyphosa, *Leptospira* spp. serovar Icterohaemorrhagiae,

Leptospira spp. serovar Copenhageni, *Leptospira* spp. serovar Canicola, *Leptospira* spp. serovar Hardjo, *Leptospira* spp. serovar Tarassovi, y *Leptospira biflexa*, también una cepa de referencia tipificada como *Leptospira* spp. serovar Pomona y certificada por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) fue utilizada como control durante los procedimientos realizados en este estudio.

2. Extracción y cuantificación de ADN de los cultivos

El ADN fue extraído de los cultivos puros utilizando el Kit QIAamp® ADN Mini Kit (QIAGEN), se siguió el protocolo previamente establecido por Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014 al cual se le realizó una modificación relacionada con el tiempo de incubación; en este sentido, se evaluó la incubación durante 3 horas (Protocolo previo) y a 1 hora 30 minutos (modificación). Se procedió a realizar la cuantificación utilizando el equipo nanodrop 2000 (Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante en el manual de usuario.

3. Estandarización de PCR gen *lipL32*.

Para preparar la PCR se utilizó la mezcla y el ADN respectivo de los cultivos sin contaminantes y el control Pomona (ICA). Para la estandarización se emplearon tres formulaciones de PCR así: en la formulación 1 se utilizaron 26 μL de Master Mix, 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 18 μL de agua libre de nucleasas, y 2 μL de ADN para un volumen final de 48 μL , con concentraciones finales de 0,2 μM de cada cebador, en la formulación 2, se contemplaron 12,5 μL de Master Mix, 0,5 μL de cebador directo, 0,5 μL de cebador inverso, 9,5 μL de agua libre de nucleasas, y 2 μL de ADN para un volumen final de 25 μL con concentraciones finales 0,2 μM de cada cebador y finalmente en la formulación 3, se emplearon 12,5 μL de Master Mix, 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 8,5

μL de agua libre de nucleasas, y 2 μL de ADN para un volumen final de 25 μL con concentraciones finales 0,4 μM de cada cebador. Los cebadores utilizados fueron reportados por León *et al*, 2006 y ratificados con un análisis bioinformático por Hernández-Rodríguez *et al*, 2014, confirmando que esta secuencia solo amplifica para el gen *lipL32* en *Leptospira* spp. patógena con un producto esperado de 423 pb.

Después de preparar los tubos fueron llevados al termociclador (Eppendorf Mastercycler®) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de cuarenta ciclos a 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 35 segundos, 72°C durante 40 segundos, y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Posteriormente, los resultados fueron observados en geles de agarosa al 1,5 % que se visualizaron en un fotodocumentador (Maestrogen).

Resultados

De las nueve cepas reactivadas tres cepas presentaron un buen desempeño en cultivo, que se evidenció por un cultivo claro sin presencia de contaminantes; además, se observó la formación del anillo de dingier, que es un indicativo de crecimiento de leptospiras como se observa en la figura 1. De esta forma, en la tabla 1 se reportan las observaciones microscópicas de las muestras analizadas. Se determinó que un 33 % (3/9) de los aislados mostraron el mayor crecimiento, estos fueron los serovares *Leptospira* spp. serovar Pomona, *Leptospira* spp. serovar Canicola, *Leptospira* spp. serovar Hardjo; por esta razón, para la fase molecular se decidió continuar los ensayos utilizando estas tres cepas. En la tabla 1 también se observa que solo en el 11 % (1/9) de los cultivos se evidenció contaminación severa.

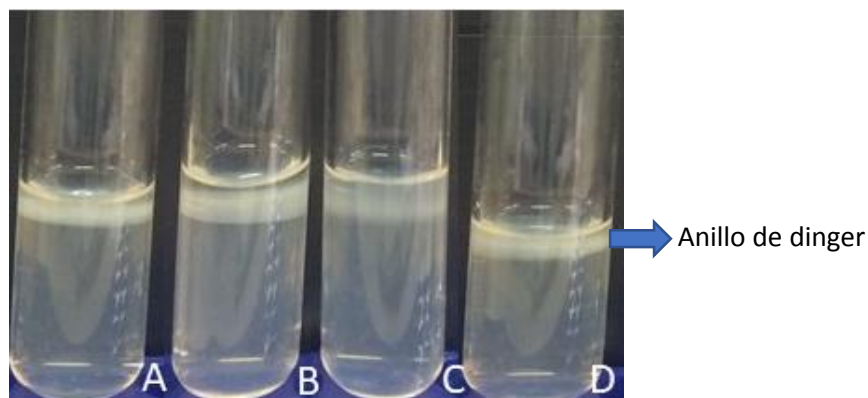


Figura 1. Cultivos de *Leptospira* spp. en medio EMJH semisólido, con crecimiento óptimo correspondiente a *Leptospira* spp. serovar Pomona (A), *Leptospira* spp. serovar Canicola (B), *Leptospira* spp. serovar Hardjo (C) y *Leptospira* spp. serovar Pomona certificada ICA (D). En todos los cultivos se observa el anillo de Dinger característico del género *Leptospira*.

Tabla 1. Observaciones en campo oscuro de los serovares de *Leptospira* spp. P:

Leptospira spp. Pomona; Br: *Leptospira* spp. serovar Bratislava, G: *Leptospira* spp. serovar Grippytyphosa, I: *Leptospira* spp. serovar Icterohaemorrhagiae, C: *Leptospira* spp. serovar Copenhageni, Ca: *Leptospira* spp. serovar Cannicola, H: *Leptospira* spp. serovar Hardjo, T: *Leptospira* spp. serovar Tarassovi, B: *Leptospira* Biflexa: P (ICA): Pomona certificada por el ICA (control).

Cepa	P	Br	G	I	C	Ca	H	T	B	P (ICA)
Crecimiento en CO	+++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+++
Contaminantes	NO	O	O	O*	O	NO	NO	O	O	NO

CO: Campo Oscuro (40X); de acuerdo con las observaciones, un cultivo positivo tiene 1 *Leptospira*, por campo óptico y se representa con un (+); si se observan más de 5 leptospiras se utiliza (++) y con más de 10 leptospiras por campo óptico (+++) (Yan *et al*, 2008). Si fueron observados contaminantes se representa con la letra O: observados, si no fue observada presencia de contaminantes se señala con las letras NO: no observados. * representa el cultivo con la mayor contaminación observada.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las cuantificaciones del ADN extraído de los tres cultivos seleccionados por su óptimo crecimiento (sin contaminantes). Con la cuantificación de ADN se determinaron, en la relación $A_{260/280}$, valores entre 1,8-2,0 que son considerados óptimos y que muestran que el ácido nucleico es puro sin contaminantes. Estos valores se evidenciaron en el 100% (3/3) de las extracciones realizadas con un tiempo de 3 horas. Los valores entre 1,6 y 1,8 son considerados aceptables, en ninguna de las extracciones se evidenciaron estos valores. Los valores $> 2,1$ que evidencian contaminación con RNA se obtuvieron en el 66% (2/3) de las extracciones realizadas en un tiempo de 1 hora y 30 minutos, y $< 1,6$ que identifican contaminación con sustancias aromáticas fue evidenciada en el 33% (1/3) de las extracciones de 1 hora y 30 minutos, estos valores son considerados no óptimos.

Con la cuantificación de ADN también se determinó la relación $A_{260/230}$ la cual muestra la pureza del ADN frente a contaminantes como polisacáridos o RNA, los valores de 2,0-2,2 son los esperados y fueron los que se evidenciaron en este estudio en el 100% (3/3) de las extracciones realizadas en un tiempo de 3 horas y en el 33% (1/3) de las extracciones realizadas en un tiempo de 1 hora y 30 minutos. Valores de 1,8-2,0 son considerados aceptables estos fueron evidenciados en un 66% (2/3) de las extracciones con un tiempo de 1 hora y 30 minutos.

Las concentraciones de ADN (ng/ μ L) fueron variables en las extracciones con un tiempo de 3 horas se evidenciaron valores inferiores a 8 ng/ μ L. En las extracciones con un tiempo de 1 hora y 30 minutos se evidenciaron valores superiores a 8 ng/ μ L.

Tabla 2. Pureza, calidad y cantidad de ácido nucleico de las extracciones realizadas con diferentes tiempos de incubación.

Tiempo	1 hora 30 minutos			3 horas		
Cepa	Relación (A _{260/280})	Concentración ADN (ng/μL)	Relación (A _{260/230})	Relación (A _{260/280})	Concentración ADN (ng/μL)	Relación (A _{260/230})
<i>Leptospira</i> spp. serovar Pomona	1,2	8,3	1,9	1,9	4,0	2,0
<i>Leptospira</i> spp. serovar Canicola	2,7	9,5	1,8	1,8	3,7	2,2
<i>Leptospira</i> <i>interrogans</i> serovar Hardjo	2,5	13,4	2,0	1,9	7,5	2,1
<i>Leptospira</i> spp. serovar Pomona (ICA)*	2,3	50,4	1,9	1,8	50,4	2,1

*Cepa control donada por el ICA

Los resultados de los tiempos de incubación demuestran que los valores óptimos en las extracciones fueron los obtenidos con un tiempo de 3 horas (1,8-2,0), valores correspondientes a una pureza y calidad óptimas; sin embargo, los resultados obtenidos para 1 hora y 30 minutos muestran valores cercanos a 2,0, que oscilaron entre 2,3 a 2,7, en la mayoría de los casos con leve diferencia frente al valor óptimo.

La tabla 3 muestra los resultados frente a las condiciones de las formulaciones; se observa, que la principal diferencia entre la formulación 1 con respecto a la 2 y 3 es el volumen del master mix, también se diferencian por la concentración empleada del ADN, en la formulación 1 fue de 2,1 ng/μL, pero en la formulación 2 y 3 se empleó una concentración de 0,32 ng/μL. Por el contrario, la diferencia entre la formulación 2 y 3, es la concentración del cebador; en la formulación 2 la concentración es de 0,2 μM, y la formulación 3 es de 0,4 μM.

Tabla 3. Resultados de PCR convencional frente a las condiciones generales del ensayo

Características	Formulaciones		
	1 (Control)*	2	3
Descripción Resultado	Producto amplificado con muy buena intensidad, sin bandas inespecíficas (carril 1 figura 2), pero se empleó una mayor cantidad de reactivos.	Producto amplificado con una banda inespecífica (carril 2; figura 2).	Producto amplificado con una buena intensidad, sin bandas inespecíficas (carril 3 figura 2); con menor cantidad de reactivos, siendo la mejor opción en la relación cantidad/gasto de reactivos.
Resultado frente a la condición de reactivos	<u>Master Mix**</u> : 26 µL <u>Cebadores</u> directo (F) e Inverso (R) c/u 1µL (concentración 0,2 uM) <u>Volumen Total</u> : 48 uL	<u>Master Mix**</u> : 12,5 µL; <u>Cebadores</u> directo (F) e Inverso (R) c/u 0,5µL (concentración 0,2 uM) <u>Volumen Total</u> : 25 uL	<u>Master Mix**</u> : 12,5 µL; <u>Cebadores</u> directo (F) e Inverso (R) c/u 1µL (concentración 0,4 uM) <u>Volumen Total</u> : 25 uL

*Protocolo utilizado en el Grupo BIOMIGEN en los ensayos de PCR para *Leptospira* spp.

La figura 2 muestra el producto de PCR con tamaño de 423 pb correspondiente al gen *lipL32*, que identifica las especies patógenas de *Leptospira* spp. En el carril 1 se observa el producto correspondiente a la formulación 1 (empleada por el grupo BIOMIGEN), que refleja una banda con mayor intensidad que se relaciona con el control positivo (Cepa Pomona certificada por el ICA); en el carril 2, se muestra el producto obtenido con la formulación 2, observando una banda inespecífica y el carril 3 muestra el producto amplificado obtenido con la formulación 3 que refleja un resultado óptimo por la definición y calidad de la banda.

A partir de los resultados se determinó que con la formulación 3 (25 µL de volumen final, 1 µL de cada cebador con una concentración de 0,4 µM) se obtuvo el mejor resultado en la relación del empleo de reactivos y la calidad del resultado obtenido. De esta manera, con la formulación 3 fue posible reducir el consumo de reactivos y con ello los costos

asociados al empleo de la técnica de PCR para la detección de *Leptospira* spp. patógena, sin afectar la calidad de los resultados obtenidos.

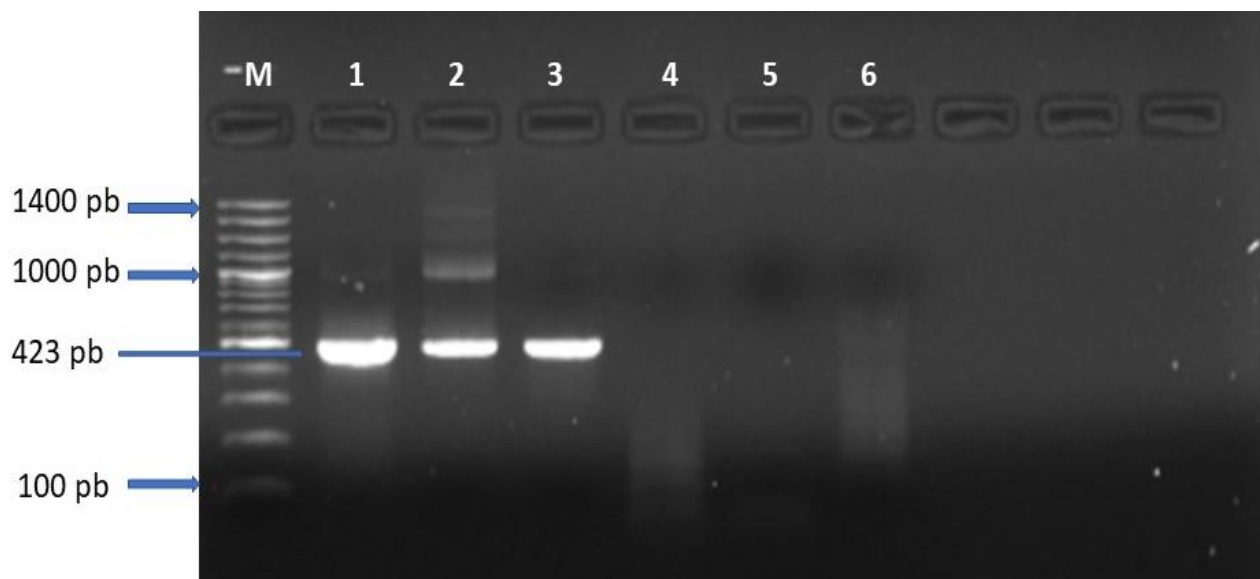


Figura 2. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio. El Carril M corresponde al marcador de peso molecular 1400 pb (Promega). En los carriles 1 a 3 se observan los productos amplificados del gen *lipL32* de *Leptospira* spp. obtenidos de las tres formulaciones empleadas en la PCR. Carril 1: Control Positivo, Pomona ICA (Formulación 1: VF 48 μ L, concentración del cebador 0.208 μ M y 2.1 ADN ng/nL); Carril 2: Pomona aislada (Formulación 2: VF 25 μ L concentración del cebador 0.2 μ M y 0.32 ADN ng/ μ L); Carril 3: Pomona aislada (Formulación 3: VF 25 μ L concentración del cebador 0.4 μ M y 0.32 ADN ng/ μ L); Carril 4: Control negativo Formulación 1; Carril 5: Control negativo Formulación 2; Carril 6: Control negativo Formulación 3.

Discusión de Resultados

Las bacterias del género *Leptospira* son demandantes nutricionalmente debido a que requieren diversos metabolitos para su supervivencia, tienen un crecimiento lento y pueden demorar de 2 semanas a 3 meses en crecer completamente en cultivo especializado (Romero *et al*, 2016; Adler *et al*, 2014; Dhayabaran *et al*, 2019). Lo anterior explica los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se evidenció un crecimiento óptimo de *Leptospira* spp. en un periodo de tres semanas. Estos resultados son similares a los presentados por Guedes *et al*, 2020, quienes reportan un crecimiento mínimo a los 14 días e

indican la dificultad en el cultivo de *Leptospira* spp. si se compara con cultivos de otras bacterias Gram negativas (Guedes *et al*, 2020).

El cultivo de *Leptospira* se realiza en medio EMJH suplementado que contiene largas cadenas de ácidos grasos como fuente de energía; sin embargo, la obtención de energía por parte de la bacteria es lenta (Evangelista y Coburn, 2010; Tamara *et al* 2018) conllevando a que los cultivos se contaminen con facilidad, debido a que estas cadenas de ácidos grasos permiten el crecimiento y la colonización de otros microorganismos (Dhayabaran *et al*, 2019).

Se ha reportado por diferentes autores la dificultad de obtener un cultivo exitoso de *Leptospira* (Goarant *et al* 2019). Bertacio y sus colaboradores reportaron un 38% de éxito (133/347) en los cultivos realizados para aislar *Leptospira* spp. (Bertacio *et al* 2018); estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo se observó crecimiento en el 100 % de los cultivos realizados; se presentó un 33 % de crecimiento óptimo, sin contaminantes; se evidenció contaminación ligera en el 55 % (cultivos recuperables) y solo el 11 % (1/9) presentó contaminación severa.

Aún con el uso de antibióticos en el medio y el ambiente estéril, se puede observar contaminación en algunas muestras, lo cual es algo común de acuerdo con reportes previos (Nogueira *et al*, 2010). Se han reportado contaminaciones ligeras en cultivos de *Leptospira* spp. entre 7% (15/215) a 39% (129/376) que son recuperables al ser sometidos a filtración para eliminar los elementos no deseados en el cultivo (Guedes *et al*, 2020; Miraglia *et al*, 2009). En este estudio se encontró un 55% (5/9) de contaminación ligera; estos resultados son comparables con los reportados por Gonzales y sus colaboradores en 2018 quienes reportan contaminación ligera en un 41% de las muestras empleadas para la identificación de *Leptospira* spp. Otros autores reportan grados de contaminación grave con pérdida de los cultivos en un 14% (Valbuena *et al*, 2015); en nuestro estudio, solo se presentó contaminación grave en un 11% (1/9); por lo tanto, este único cultivo contaminado se

descartó debido a que realizar extracciones con contaminantes llevaría a obtener ADN de baja pureza y calidad (Arseneau et al, 2017). Un cultivo apropiado, en lo posible libre de contaminación, es importante para obtener ADN puro y aplicable en pruebas moleculares (Arseneau et al, 2017). De acuerdo con lo anterior; en este estudio, los cultivos que presentaron resultados excelentes, sin contaminantes, correspondieron al 33% (3/9) y fueron los seleccionados para las extracciones de ADN realizadas.

Durante los procesos de extracción se emplea la enzima proteinasa K, diversos aspectos como la temperatura y tiempo de incubación afectan la efectividad de la esta enzima (Villumsen et al, 2010; Arana et al, 2016; Ahmed et al, 2020; Nagraik et al 2019), en el protocolo del fabricante establece periodos de incubación de 1 a 3 horas y algunos autores han reportado buena efectividad en un lapso menor a 3 horas (Wise et al, 2016; Xiao et al, 2019). En este trabajo se evaluaron dos tiempos: 1 hora 30 minutos y 3 horas; encontrándose que en el tiempo de incubación de 3 horas se lograron resultados óptimos con ADN de mejor calidad; este resultado puede atribuirse al efecto de la proteinasa K en el proceso de incubación, debido a que con un tiempo mayor de incubación esta enzima puede actuar durante un lapso mayor, logrando romper los enlaces peptídicos de las proteínas y la pared celular bacteriana de *Leptospira* spp. logrando resultados óptimos.

Respecto a las cuantificaciones en un periodo de 3 horas se evidenció que el total de los ADN extraídos tuvieron valores entre 1,8-2,0 (relación $A_{260/280}$); estos resultados son coherentes con otros reportados previamente que se han considerado con calidad y pureza óptimos, sin presencia de proteínas o RNA; libres de contaminantes (Vaidya et la, 2018). Igualmente, en este trabajo fueron obtenidos valores entre 2,0-2,2 (relación $A_{260/230}$), en el 100% de los ADN extraídos, en un periodo de 3 horas; estos resultados coinciden con reportes previos que muestran que estos valores corresponden a un ADN puro, sin presencia de contaminantes orgánicos (Bunu et al, 2020).

En este trabajo los resultados de extracción de ADN, obtenidos en el periodo de 1 hora y 30 minutos, mostraron valores diferentes al rango 1,8-2,0 (óptimo) en la relación $A_{260/280}$; sin embargo, los valores obtenidos en este tiempo de incubación fueron cercanos, oscilaron entre 2,3-2,7, se evidenció que el 75% de estos fueron cercanos a 2,0. Estos resultados se pueden explicar debido a que las bacterias pertenecientes a *Leptospira* spp., presentan una mayor cantidad de lipopolisacáridos en su membrana externa y los ácidos grasos presentan cuatro enlaces amino en el lípido A, en lugar de dos como en otras bacterias Gram negativas; lo cual implica, un mayor tiempo para degradarse y hacer lisis, en comparación con otras bacterias Gram negativas (Haake y Zückert, 2015; García-González *et al*, 2015).

La relación $A_{260/230}$ es considerada una medida secundaria de la pureza y calidad del ADN, se emplea para determinar la presencia de contaminantes orgánicos los cuales son subproductos del proceso de extracción de ADN como polisacáridos (O'Neill, 2011; Kgomotso *et al*, 2015). De esta manera, los resultados de este estudio demuestran que el 100% de las muestras utilizadas que fueron sometidas a un periodo de incubación de 1 hora y 30 minutos, mostraron valores cercanos a 1,9-2,0; lo cual permitió, considerarlas sin presencia de compuestos orgánicos e indicando que un tiempo de incubación de 1 hora y 30 minutos fue suficiente para liberar estos compuestos de las muestras. Adicionalmente, la presencia de compuestos orgánicos presentes en el ADN a amplificar dificulta el proceso de PCR (Saenz *et al*, 2019; Vaidya *et al*, 2018); por consiguiente, con los resultados obtenidos en este trabajo se pudo establecer que el ADN empleado fue de buena calidad y no afectó el resultado de PCR, como se observa en los carriles 1 y 3 de la figura 2 que indican un buen producto amplificado con una banda nítida y de buena calidad.

Por el contrario, en el carril 2, figura 2, se observa una banda inespecífica, correspondiente a la formulación 2; que tiene una concentración de cebador de 0,2 μ M, igual

a la formulación 1, pero menor a la formulación 3 (0,4 μ M) y con una concentración de ADN de 0,34 ng/ μ L, igual a la formulación 3, pero menor a la formulación 1 (2,1 ng/ μ L). Los resultados obtenidos en este estudio, con diferentes concentraciones de cebador y ADN, coinciden con reportes previos, que muestran presencia de bandas inespecíficas, en los productos de la PCR en tiempo real (qPCR), resultado de la estandarización de la técnica, donde se probaron diferentes volúmenes y concentraciones del cebador (1,0 μ L a 3,0 μ L y 10 ng /nL a 25 ng /nL) (Chauve *et al*, 2020; Jonhson *et al*, 2019; Garafutdinov *et al*, 2015). Adicionalmente, las concentraciones de cebador y ADN afectan la formación de estructuras secundarias; de esta forma, una baja concentración de cebador aumenta la probabilidad de uniones ADN-ADN inespecíficas y causa resultados inadecuados debido a que la velocidad de anillamiento, entre el cebador y el ADN blanco, está determinada por sus concentraciones e incrementa la presencia de bandas inespecíficas (Qamar *et al*, 2017; Arana *et al*, 2016; Murat *et al*, 2020; Farrar *et al*, 2015). Así mismo, es probable que se afecte la temperatura de fusión y acoplamiento; aumentado la formación de dímeros, relacionados con bandas inespecíficas en los productos de PCR (Guernier *et al*, 2018; Nakano *et al*, 2003; Guido *et al*, 2017; Morozov *et al*, 2016; Zhaocheng *et al*, 2021; Batien *et al*, 2008; Chen *et al*, 2015; Gaby *et al*, 2017; Lorenz, 2012; Dey, 2018).

Otro factor que puede generar productos inespecíficos, es el diseño inadecuado de los cebadores debido a que no hay un buen acoplamiento con el ADN, también puede llevar a diferencias en las temperaturas de fusión, siendo difícil seleccionar la adecuada para el anillamiento con el cebador (Lorenz, 2012; Ahmed *et al*, 2020; Abdel *et al*, 2018); sin embargo, en este estudio los cebadores utilizados fueron previamente reportados por Leon *et al*, 2006, y confirmados mediante estudios bioinformáticos por Hernández-Rodríguez *et al*, 2014, comprobando la especificidad para el gel *lipL32* presenten exclusivamente en especies patógenas de *Leptospira* spp.

Conclusiones

- En el 100% de las muestras sometidas a un tiempo de incubación de 3 horas se obtuvo un ADN de pureza y calidad óptimo (1,8-2,0) con cuantificaciones útiles en la identificación del gen *lipL32* de *Leptospira* spp. por PCR convencional y se evidenció que el ADN obtenido en un tiempo de incubación de 1 hora 30 minutos, presentó valores cercanos a 2,0, aceptables también para la amplificación por PCR.
- El gen *lipL32* se identificó en todas las muestras analizadas por PCR, obteniendo un producto de 423 pb, con una buena calidad e intensidad de la banda; permitiendo establecer a la formulación 3, con el menor volumen final (25 uL), como la óptima frente a la formulación 1 previamente utilizada (48 uL).
- Con este trabajo se contribuye en la reducción de costos para la identificación molecular de *Leptospira* spp. con lo cual se puede realizar un diagnóstico temprano, contribuyendo en la reducción de problemas reproductivos, reduciendo costos en las producciones y minimizando el impacto en salud pública.

Agradecimientos

Este proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Celular y Molecular de la Sede Candelaria de la Universidad de La Salle, Bogotá Colombia; por lo cual, se agradece a esta entidad el haber facilitado los espacios y equipos necesarios para llevar a cabo el trabajo e igualmente se agradece al grupo BIOMIGEN (Biología Molecular e inmunogenética) por los insumos de laboratorio y las muestras para el desarrollo de este trabajo.

Referencias

1. Abdel Rahman M. Zueter, Azian Binti Harun., 2018. Development and Validation of Conventional PCR for the Detection of the sctQ Gene. *Jordan Journal of Biological Sciences*. Volume 11, Number 4, ISSN 1995-6673, Pages 435 – 439.
2. Adler, B. De la Pena Moctezuma, A., 2010. Leptospira and leptospirosis, *Veterinary Microbiology*. 140 (2010) 287–296.
3. Adler, B., 2014. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Veterinary Microbiology* 172. 353–358
4. Ahmed AA, Goris MGA, Meijer MC (2020) Development of lipL32 real-time PCR combined with an internal and extraction control for pathogenic *Leptospira* detection. *PLoS ONE* 15(11): e0241584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241584>.
5. Arana, Franklyn & Sánchez, Ronald & Díaz, Acela & Pérez, Bertha & Quiñones, Madelaine. (2016). Desarrollo de un método para el diagnóstico específico del PepMoV basado en la RT-PCR. 31. 20-28.
6. Arseneau JR, Steeves R, Laflamme M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Mol Ecol Resour*. 2017 Jul;17(4):686-693. doi: 10.1111/1755-0998.12616. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27768249.
7. Baquero Parra Mónica, Gómez Arlen Patricia, Rodríguez Hernández Patricia. 2010. Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp. *Revista de Medicina Veterinaria* N.º 19.
8. Barreto Argilagos, Guillermo, Rodríguez Torrens, Herlinda de la Caridad, García Casas, Tatiana, & Vázquez Montes de Oca, Roberto. (2020). Comportamiento de la leptospirosis en reactores positivos porcinos y humanos durante un decenio en la provincia Camagüey. *Revista de Salud Animal*, 42(2), e03. Epub 01 de agosto de

2020. Recuperado en 09 de febrero de 2021, de
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253
9. Bertasio C, Papetti A, Scaltriti E, Tagliabue S, D'Incau M, Boniotti MB. Serological Survey and Molecular Typing Reveal New *Leptospira* Serogroup Pomona Strains among Pigs of Northern Italy. *Pathogens*. 2020;9(5):332. Published 2020 Apr 29. doi:10.3390/pathogens9050332.
 10. Boletín Epidemiológico Semanal, Semana epidemiológica 15,5 al 11 de abril de 2020, Instituto nacional de salud recuperado de (https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_15.pdf)
 11. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. 2011. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 49, No. 6.
 12. Bunu SJ, Otele D, Alade T, Dodoru RT. Determination of serum DNA purity among patients undergoing antiretroviral therapy using NanoDrop-1000 spectrophotometer and polymerase chain reaction. *Biomed Biotechnol Res J* 2020;4:214-9.
 13. Calderón, A., Rodríguez, V., Máttar, S., Arrieta, G. 2013. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics, *Tropical Animal Health and Production*. Volumen 46, Issue 2, pp 427–432
 14. Chandan, S., Umesha, S., Bhure, S., Haraprasad, N., & Chandrashekar, S. (2018). Development of PCR assay for targeting partial lipL21 and lipL41 gene of *leptospira* Nepal *Journal of Biotechnology*, 1(1), 22-30.
<https://doi.org/10.3126/njb.v1i1.4170>.
 15. Chen, S., Cao, Y., Li, T. *et al.* Simultaneous detection of three wheat pathogenic fungal species by multiplex PCR. *Phytoparasitica* 43, 449–460 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s12600-014-0442-1>

16. Costa Ooteman M, Ravara Vago A, Cota Kour M, 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 65, Issue 2, Pages 247-257, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.015>.
17. De Brito Thales, Gonçalves da Silva Ana Maria, Estima Abreu Patrícia Antonia. 2018. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201860023>.
18. Dey, P. (2018). Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*, 201–211. doi:10.1007/978-981-10-8252-8_20
19. Dhayabaran, V., Chidambaram, D., & Krishnaswamy, P. R. (2019). Identification of compounds for improved growth of *Leptospira* in culture and isolation. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 114923. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2019.114923.
20. Equipo Zoonosis Subdirección de Prevención Vigilancia y Control en Salud Pública Instituto Nacional de Salud Protocolo de vigilancia pública. Leptospirosis código: 355. Instituto nacional de salud.
21. Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2015). Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15-60 seconds. *Clinical chemistry*, 61(1), 145–153. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228304>
22. Gaby, J.C., Buckley, D.H. The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance. *Microb Ecol* 74, 701–708 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>

23. García-González R, Reyes-Torres A, Basilio-Hernández D, Ramírez-Pérez M, Rivas-Sánchez B. 2015. Leptospirosis; un problema de salud pública.
www.medigraphic.com/patologiaclinica.
24. Goarant, C., Trueba, G., Bierque, E., Thibeaux, R., Davis, B. and De la Peña Moctezuma. 2019. *Leptospira* and Leptospirosis. In: J.B. Rose and B. JiménezCisneros, (eds) Global Water Pathogen Project.
<http://www.waterpathogens.org> (<http://www.waterpathogens.org/>) (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria) <http://www.waterpathogens.org/book/>
(<http://www.waterpathogens.org/book/Vibrio>)[leptospira-and-leptospirosis](http://www.waterpathogens.org/book/Vibrio)
(<http://www.waterpathogens.org/book/leptospira-and-leptospirosis>) Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. Acknowledgements: K.R.L. Young, Project Design editor; Website Design (<http://www.agroknow.com>).
25. Guedes I B, de Souza Rocha K, Pierre Negrão M, Oliveira de Souza Guizele, Fernandes de Paula Castro J, Burilli Cavalini M, de Souza Filho M. A, Soares Damasceno Neto M, Aizawa J, Guimarães de Moraes C. M, Heinemann M. B.2020. *Leptospira* transport medium (LTM): A practical tool for leptospire isolation, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 175, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105995>.
26. Haake DA, Zückert WR. The leptospiral outer membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:187-221. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_8.
27. Hernández-Rodríguez Patricia, Gomez Ramirez Arlen, Baquero Mónica, Quintero Gladys.2014. Identification of ompL1 and lipL32 Genes to Diagnosis of Pathogenic *Leptospira* spp. Isolated from Cattle. *Open Journal of Veterinary Medicine*. Volumen 4. Paginas 102-112. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2014.45012>
28. Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C., Dalmau, E., Quintero, G. (2011). A comparison between Polymerase Chain Reaction (PCR) and traditional techniques for the

- diagnosis of Leptospirosis in bovines, *Journal of Microbiological Methods*, Elsevier, 84, 1-7.
29. Hoseinpur R, Khaki P M, Noofeli S, Bidhendi M.(2015). Molecular detection of pathogenic leptospiral serovars by PCR, based on lipL21 gene. *Archives of Razi Institute*, 70(4), 223-227. doi: 10.7508/ari.2015.04.001-
30. Jacobs, A.C., Harks, F. M., Hoeijmakers, Collell, M., Segers, R.P.A.M., 2015. Safety and efficacy of a new octavalent combined Erysipelas, Parvoand Leptospira vaccine in gilts against *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated disease and fetal death. *Vaccine*- Vol 33. Pag 3963–3969.
31. Léon, A., Pronost, S., Tapprest, J., Foucher, N., Blanchard, B., André-Fontaine, G., Laugier, C., Fortier, G. and Leclercq, R. (2006) Identification of Pathogenic *Leptospira* Strains in Tissues of a Premature Foal by Use of Polymerase
32. Loong, S.K., Khor, C.S., Chen, H.W., Chao, C.C., Ling, I.S.C., Abdul Rahim, N.F., Hassan, H., ellis, S., Ching, W.M. and AbuBakar, S. 2018. Serological evidence of high *Leptospira* exposure among indigenous people (Orang Asli) in Peninsular Malaysia using a recombinant antigen-based ELISA. *Tropical Biomedicine*. Volumen 35.
33. Lovera, R., Fernández, M., Jacob, J., Lucero, L., Morici, G., Brihuega, B., Farace, M., Caracostantogolo, J., Cavia, R. 2017. Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. *PLoS Negl Trop Dis*. Volumen 11(6): e0005722.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005722>.
34. Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), e3998.
<https://doi.org/10.3791/3998>.

35. Mata-Haro V, Acedo, E. Pinelli-Saavedra, A. Bioseguridad. Limpieza y desinfección. En: Susana Verónica del Castillo Pérez, Álvaro Ruíz, Jesús Hernández, Josep Gasa, Editores. Manual de Buenas Prácticas de Producción Porcina. Lineamientos generales para el pequeño y mediano productor de cerdos. *Red Porcina Iberoamericana*. 2012: 14-25.
36. Miotto B A, Santana da Hora A, Taniwaki S. A, Brandão P. E, Heinemann M. B, Hagiwara M.H. 2018. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipI32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples, *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 49, Issue 3, Pages 584-590, ISSN 1517-8382, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838217303283>)
37. Miraglia, Fabiana, Moraes, Zenaide Maria de, Melville, Priscilla Anne, Dias, Ricardo Augusto, & Vasconcellos, Silvio Arruda. (2009). EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp
38. Murat, P., Guilbaud, G. & Sale, J.E. DNA polymerase stalling at structured DNA constrains the expansion of short tandem repeats. *Genome Biol* 21, 209 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02124-x>.
39. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J (2015) Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003843. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843>
40. Nagraik R, Kaushal A, Gupta S, Dhar P, Sethi S, Dinesh Kumar. 2019. Optimized DNA- based bioassay for *Leptospira interrogans* detection:a novel platform for leptospirosis diagnosis. *Biotech*. Volumen 9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1815-4>.
41. Nogueira, Denise & Costa, Flávia & Bezerra, Camila & Silva, Maria & Costa, Diego & Viana, Maira & Silva, José & Araujo Jr, Joao & Malossi, Camila & Ullmann, Leila &

- Santos, Carolina & Alves, Clebert & Azevedo, Sérgio. (2020). Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. *Acta Tropica*. 207. 105497. [10.1016/j.actatropica.2020.105497](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105497).
42. Ospina-Pinto, C., Rincón-Pardo M., Soler-Tovar, D., Hernández-Rodríguez, Patricia. (2019). Alteration of the Reproductive Indicators by the Presence of *Leptospira* spp. in Sows of Swine Farms. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47: 1628: 1-8. <http://www.ufrgs.br/actavet/47/PUB%201628.pdf>
43. Ospina-Pinto, M. C., & Hernández-Rodríguez, Patricia. (2021). Identification of *Leptospira* spp. in the animal-environment interface (swine-water) in pig production cycle. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 1-9.
44. Pulido-Villamarín, Adriana, Castañeda-Salazar, Rubiela, Mendoza-Gómez, María Fernanda, & Vivas-Díaz, Laura. (2019). Presencia de anticuerpos frente a algunos patógenos de interés zoonótico en cuatro granjas porcícolas de Cundinamarca, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 446-454. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15702>
45. Raghavan U.M. Palaniappan, Yung-Fu Chang, Chao-Fu Chang, M.J. Pan, C.W. Yang, Peter Harpending, Sean P. McDonough, Edward Dubovi, Thomas Divers, Jiaxin Qu, Bruce Roe. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and Cellular Probes*, Volume 19, Issue 2, Pages 111-117, ISSN 0890-8508, <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.002>.
46. Riediger, I. N., Stoddard, R. A., Ribeiro, G. S., Nakatani, S. M., Moreira, S., Skraba, I., Biondo, A. W., Reis, M. G., Hoffmaster, A. R., Vinetz, J. M., Ko, A. I., & Wunder, E. A., Jr (2017). Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(9), e0005940. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005940>.

47. Robertson Ian D. 2020. Disease Control, Prevention and On-Farm Biosecurity: The Role of Veterinary Epidemiology, *Engineering*. Volumen 6, Paginas 20-25, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.10.004>.
48. Romero R, Valido Díaz A y Álvarez Montan A. 2016. Necesidades ecológicas y ambientales de las leptospiras para su supervivencia en el ecosistema: conocerlas para evitarlas. *Medicentro Electrónica* vol.20 no.3.
49. Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*. Volumen 15. DOI: 10.1186/1480-9222-15-5. Obtenido de: <https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1480-9222-15-5>
50. Silva Gustavo S, Leotti Vanessa B, Castro Stela M.J, Medeiros Antonio A.R, Silva Ana P.S.P, Linhares Daniel C.L, Corbellini Luis G. 2019. Assessment of biosecurity practices and development of a scoring system in swine farms using item response theory. *Preventive Veterinary Medicine*. Volumen 167. Páginas 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.020>.
51. Suescún Carrero S, H, Heredia Montoya D, P, Bolaños Y, M, Pulido Medellín M,O. 2017. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova*. Volumen 17. Páginas 131-138.
52. Tamara Ricardo, Lucas D. Monje, Noelia Landolt, Yos,ena T. ChianiM. Fernanda Schmeling, Pablo M. Beldoménico N, Bibiana VanascoM Andrea Previtali. (2018). Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*. *Revista de Panamama de Salud Pública*. páginas 42- 23 <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.83>.
53. Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M. E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., & Goarant, C. (2018). Biodiversity of

- Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 9, 816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>.
54. Vaidya Jueeli D., van den Bogert Bartholomeus, Edwards Joan E., Boekhorst Jos, van Gastelen Sanne, Saccenti Edoardo, Plugge Caroline M., Smidt Hauke.2018. The Effect of DNA Extraction Methods on Observed Microbial Communities from Fibrous and Liquid Rumen Fractions of Dairy Cows. *Frontiers in Microbiology*. VOLUME 9. PAGES 92. DOI=10.3389/fmicb.2018.00092.
55. Valbuena-Torrealba, Carolina; Péfaur-Vega, Jaime Eduardo. Determinación de leptospirosis en roedores y marsupiales de la región Sur del Lago de Maracaibo, estado Mérida, Venezuela Revista Científica, vol. XXV, núm. 3, mayo-junio, 2015, pp. 193-199 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela
56. Villumsen, S., Pedersen, R., Krogfelt, K. A., & Jensen, J. S. (2010). Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: improved method for DNA extraction from blood cultures. *PloS one*, 5(8), e12095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012095>
57. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, *et al.* (2019) Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(5): e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.
58. Waggoner, J. J., Balassiano, I., Abeynayake, J., Sahoo, M. K., Mohamed-Hadley, A., Liu, Y., Vital-Brazil, J. M., & Pinsky, B. A. (2014). Sensitive real-time PCR detection of pathogenic *Leptospira* spp. and a comparison of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of leptospirosis. *PloS one*, 9(11), e112356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112356>.
59. Wang, Z., Jin, L., Węgrzyn, A. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*. doi:10.1186/1475-2859-6-39

60. Xu, C., Loftis, A., Ahluwalia, S. K., Gao, D., Verma, A., Wang, C., & Kaltenboeck, B. (2014). Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. *PloS one*, 9(2), e89507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089507>
61. Yan, W., Faisal, S., Divers, T., McDonough, S., Akey, B. and Chang, Y.-F. (2010), Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kennewicki Infection of Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 912-917. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.00507.x
62. Yinghua Xu & Qiang Ye (2018) Human leptospirosis vaccines in China, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14:4, 984-993, DOI: 10.1080/21645515.2017.1405884.
63. Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, Briano C, Ashfield N, Da Silva Silveira C, Dutra F, Easton C, Fraga M, Giannitti F, Hamond C, Macías-Rioseco M, Menéndez C, Mortola A, Picardeau M, Quintero J, Ríos C, Rodríguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto F, Riet-Correa F, Buschiazzi A; Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Sep 13;12(9):e0006694. doi: 10.1371/journal.pntd.0006694. PMID: 30212451; PMCID: PMC6136691.
64. Zhaocheng Liu, Jinli Sun, Guodong Zhao, Shangmin Xiong, Yong Ma, Minxue Zheng. 2021. Transient stem-loop structure of nucleic acid template may interfere with polymerase chain reaction through endonuclease activity of Taq DNA polymerase. *Gene*. Volumen 764. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145095>.