



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y DE LA
ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN *BccI* PARA LA DETECCIÓN
DIFERENCIAL DE CUATRO SEROVARES DE *Leptospira interrogans*.
ESTUDIO PRELIMINAR.**

Javier Alonso Bravo Músare

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA
CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y DE LA
ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN *BccI* PARA LA DETECCIÓN
DIFERENCIAL DE CUATRO SEROVARES DE *Leptospira interrogans*.
ESTUDIO PRELIMINAR.**

Javier Alonso Bravo Músare

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CORRECTOR : CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CORRECTOR : PEDRO ABALOS PINEDA

FIRMA
.....
.....
.....

SANTIAGO, CHILE
2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero que todo, a Dios por abrirme las puertas de este mundo maravilloso de conocimiento, lleno de gente preciosa que estuvo conmigo en diferentes etapas de mi carrera.

También quiero agradecer a todos quienes aportaron de una u otra forma a que me realizara como profesional, partiendo por el trabajo de vida que realizaron mis padres conmigo. Su apoyo incondicional y su guía, mostrándome un camino necesario para darme cuenta del lugar que ocupó en el mundo, y la responsabilidad que esto conlleva.

Mi hermana, que con su tenacidad dentro de su profesión, me inspiró a terminar este proceso, además de su constante apoyo, cariño y comprensión, pero por sobre todo, su amistad.

Mis tíos y primos, que siempre supieron decirme las cosas que necesitaba tener en mente para resolver las interrogantes que conversaba con ellos.

Mis amigos, en especial a la Lita, el Raúl, el Facha, el Alejo, el Lalo, y a todos quienes estuvieron conmigo todo este tiempo, que son fotos de diversos momentos en mi “memoria”, las que guardo con cariño en mi corazón.

A todos mis profesores, los que participaron en la realización de este trabajo, a todos los que me acompañaron en el aprendizaje de las herramientas que me llevaron a ser un gran profesional, tal como lo son ellos, mis ejemplos a seguir.

Al profesor Carlos Navarro Venegas, que fuera de ser mi guía en la realización de este trabajo, lo sentí como mi compañía en esta aventura científica, que ha sido un gran aporte para mí como lo fue con mis predecesores.

A la Dra. María Antonieta Jara, que me aconsejó, me ayudó, y me acompañó en la realización de esta memoria. Además, en conjunto con el Profeso Navarro, me conocen desde que inicié mis pasos en esta carrera.

A mi amigo, Nicolás Tamayo, que logró sacar la fuerza que había en mí para pararme y hablar con confianza de las cosas que sabía.

Al mi amigo, Dr. Rene Alegría, por ayudarme a pasar por estas instancias, con su generosidad, sus conocimientos y su compañía.

A la Dra. María Cristina Madariaga, mi guía en los trabajos que realice en el SAG. Su recibimiento y sus consejos impulsaron aún más las ganas por realizar de excelente

forma mi trabajo.

Pero también a aquellos que también hicieron el camino difícil. Aquellos que pusieron todas esas barreras que obstaculizaban mi paso a ser Médico Veterinario. Bastante sirvió eso en mi desempeño. A los que dijeron que pensara en dedicarme a otra cosa. Los que no creyeron. Observen. Soy Médico Veterinario, y gracias por eso, porque ahora soy más fuerte que antes.

Pero además de agradecer, quería dedicar mi trabajo a 3 personas importantes. Motores de mis logros y este en especial. A mi Abuela Graciela Flores Araneda, que no logró verme titulado, pero este logro es para ella también, y a Catalina y Paulina, mis grandes amores en esta vida, y “más allá”.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Revisión Bibliográfica	4
Objetivos	10
Material y Métodos	11
Resultados	14
Discusión	16
Conclusión	18
Bibliografía	19
Anexos	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Gel de agarosa al 2% del gen <i>lipL32</i> para <i>Leptospira interrogans</i>	14
2	Gel de agarosa al 2% del gen <i>lipL32</i> y resultado de digestión con <i>BccI</i>	15

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial, que afecta tanto a animales como a humanos. Es transmitida por la orina de todo animal infectado dentro de los cuales los roedores son uno de los más reconocidos, además de poder ingresar al organismo a través de elementos contaminados como alimentos o el agua de bebida, e incluso por mucosa o piel erosionada. *Leptospira interrogans* serovar *canícola*, *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovar *pomona* y *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* afectan a caninos, porcinos, equinos y bovinos. Existe especial preocupación ante la posibilidad de infección con esta bacteria, produciendo cuadros de signología variada, desde fiebres oscilantes, enfermedad renal, hemorragias, e incluso la muerte. Producto de las características de esta enfermedad, y de los múltiples serovares patógenos de este agente, se hacen necesarios métodos diagnósticos con los cuales se pueda detectar la leptospirosis y diferenciar sus serovares, en lo posible, de una forma rápida, exacta y por su condición de enfermedad infecciosa, segura.

Es así como surge la interrogante de un método diagnóstico diferencial de cuatro serovares patógenos de *Leptospira*, plasmados en el objetivo de esta Memoria de Título, añadiendo al protocolo, la participación de la enzima de restricción: *BccI*, del cual se obtendrán fragmentos de distinto tamaño que permitirían la discriminación entre los serovares expuestos anteriormente.

Como conclusión para este estudio, la detección de *Leptospira interrogans* mediante PCR fue exitosa, demostrando que los partidores diseñados son específicos para este agente. No así con la diferenciación de los 4 serovares de *Leptospira*, debido a que la enzima de restricción escindió la doble hebra de ADN, en los 4 serovares, entregando resultados distintos a los esperados.

Palabras Clave: *Leptospira*, PCR, endonucleasa de restricción, *BccI*, LipL32

ABSTRACT

Leptospirosis is a world disease, affecting both animals and humans, which is transmitted by all infected animal, having the rodents as the most recognized, or enters the body through contaminated elements such as food or drinking water, and even by mucosa or eroded skin. *Leptospira interrogans* serovar *canícola*, *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovar *pomona* y *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* affect canines, pigs, horses and cattle, making it a concern since it affects pets and productive animals, producing varied signology, from oscillating fever, kidney disease, hemorrhages, to death. Due to the characteristics of this disease, and of the number of pathogenic serovars of the causative agent of this disease, diagnostic methods are necessary in order to detect leptospirosis and to differentiate its serovars in a fast, accurate and because of its infectious, safe condition.

This is how the question of a differential diagnosis method of four *Leptospira* serovars, expressed in the objective of this work, through the molecular technique of the polymerase chain reaction (PCR), arises, adding the action of the restriction enzyme *BccI*, and thus generate fragments of different size for the differentiation of the serovars discussed above, by recognition of the gene encoding a lipoprotein membrane, LipL32.

As conclusion for this study, the detection of *Leptospira interrogans* by PCR was successful also proving that the primers designed for the realization of the method are specific for this agent. Not so with the differentiation of the 4 serovars of *Leptospira*, because the restriction enzyme cleaves the double strand of DNA, in the 4 serovars, delivering different results than expected.

Key words: *Leptospira*, PCR, restriction endonuclease, *BccI*, LipL32.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por *Leptospira spp.*, de distribución mundial y de gran importancia económica, ya que afecta a la mayoría de los animales domésticos, incluyendo bovinos, ovinos, caprinos, equinos y caninos. La enfermedad se caracteriza por presentar signos tales como: en su inicio, fiebre, mialgia, y dolor de cabeza, para luego presentar insuficiencia renal, hemorragia pulmonar, baja de la producción láctea, infertilidad, aborto e incluso muerte. Debido a que el curso de la leptospirosis varía desde presentaciones leves a letales, es importante lograr un diagnóstico temprano a través de técnicas de laboratorio.

El cultivo del patógeno *-Leptospira-* es la aproximación más exacta, pero esta técnica es altamente compleja, lo que se traduce en un requerimiento excesivo de tiempo para su determinación. Por otra parte, las técnicas serológicas para acceder a la respuesta humoral -que de todas maneras no contribuyen al diagnóstico temprano- son aplicables después de un periodo de 7 a 10 días desde la aparición de la enfermedad.

Así, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se presenta como una técnica molecular eficiente para lograr el diagnóstico de leptospirosis en forma rápida, sensible y específica. Este método ha sido utilizado sobre todo para el diagnóstico de microorganismos difíciles de cultivar y así es como varios investigadores lo han utilizado para detectar las serovariedades de *Leptospira* en los diferentes casos clínicos en los cuales se sospecha de la infección por este agente.

En este contexto, en la presente memoria de título se propone utilizar la técnica de PCR utilizando como blanco de detección el gen de la proteína LipL32, una lipoproteína expresada en la membrana externa de la bacteria y altamente conservada entre las especies patógenas de *Leptospira spp.* asociándolo al proceso de digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *BccI* como método molecular que permita discriminar entre *Leptospira interrogans* serovar *canicola*, *L. interrogans* serovar *pomona*, *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* y *L. interrogans* serovar *grippotyphosa*, contribuyendo al estudio epidemiológico de la enfermedad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La leptospirosis es probablemente la zoonosis más diseminada en el mundo (Adler, 2014). El microorganismo infecta a una gran variedad de mamíferos, tanto domésticos como silvestres y el cuadro suele presentar un inicio abrupto con fiebre, mialgias y dolor de cabeza. Aunque la mayoría de los casos son leves o moderados, el curso clínico se complica con insuficiencia renal, uveítis, hemorragia pulmonar, distrés respiratorio, miocarditis, rhabdomiolisis y meningitis (Olmo *et al.*, 2014).

Normalmente los perros son vacunados contra dos de los serovares de *Leptospira interrogans*: *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, pero esto no asegura una completa inmunidad. Así, para tomar una decisión terapéutica temprana y apropiada, los médicos veterinarios han diferenciado la leptospirosis de otras enfermedades, como por ejemplo piroplasmosis o enteritis parvoviral, cuyos signos clínicos son similares a los de la leptospirosis, pero que requieren de tratamientos completamente diferentes. En la actualidad, se determina la presencia de infección mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT), sin embargo, sus resultados son ambiguos ya que la aglutinación se produce tanto como resultado de la misma vacunación, como por la infección (Andre-Fontaine *et al.*, 2015).

Las leptospiras son bacterias Gram negativas, helicoidales, pertenecen al género *Leptospira*, familia *Leptospiraceae*, orden espiroquetales (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Estudios de ADN, determinaron su clasificación taxonómica. Es así como el género *Leptospira* incluye tres especies no patógenas: *L. biflexa*, *L. meyerii*, *L. wolbachii*, y siete especies patógenas: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii*; que contemplan 24 serogrupos y 237 serovares (Zunino y Pizarro, 2007). Es característico en las leptospiras un extremo en forma de gancho. Posee dos flagelos, que son los responsables del movimiento de la espiroqueta (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). El genoma de *L. interrogans*, consta de 4.691.184 pares de bases (pb). Consiste de dos cromosomas circulares, uno grande de 4.332.241 pb y uno más pequeño de 358.943 pb, aproximadamente (Xiren *et al.*, 2003).

En Chile, la leptospirosis humana es una enfermedad de notificación obligatoria inmediata, y la *Leptospira* es un agente de vigilancia en el laboratorio, según lo establece el Decreto Supremo 158 en sus artículos 1° y 9°. El médico tratante debe notificar en forma inmediata el caso sospechoso de leptospirosis a la autoridad sanitaria por la vía más expedita (CHILE, MINSAL, 2005). La confirmación del diagnóstico en animales se reduce a muestras procesadas en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), en la Universidad Austral de Chile o a aquellas enviadas para el diagnóstico diferencial con infección por hantavirus al Instituto de Salud Pública (ISP). El estudio etiológico se inició en el ISP a partir del año 2000 y a contar del 17 de abril de 2000, el Reglamento sobre enfermedades de notificación obligatoria por el Ministerio de Salud (MINSAL), estableció la vigilancia de laboratorio de *Leptospira* sp por el ISP (Zunino y Pizarro, 2007).

El primer informe acerca de leptospirosis en roedores en Chile fue hecho por Ruiz en 1938, quien llega a resultados negativos, a pesar de haber encontrado la bacteria en la orina de estos roedores, dado que no logró cultivarla y la serología también resultó negativa. Sin embargo, el fracaso se debió a que el medio de cultivo era inadecuado. Además, la negatividad de las reacciones serológicas se pudieron deber a que solamente se utilizó un serovar como antígeno, y por esto, no se pudo detectar anticuerpos frente a otros serovares. Durante los años 50, estudios realizados en la zona central del país (Zamora y Riedemann, 1999), comprobaron que ratas y ratones son portadores de *Leptospira* spp. tanto en el matadero de Santiago como en plantaciones de arroz de la séptima Región. También hay estudios de infección en otros animales de vida libre, detectando anticuerpos solamente en zorros (*D. culpoeus* y *D. griseus*) en un 7.4%, ya sea frente a *gryppotyphosa* como también *icterohaemorrhagiae*, sospechándose que se debe a que las ratas son gran parte de la dieta de los zorros (Zamora y Riedemann, 1999).

Existen datos de que, en un grupo de 56 alpacas (*Vicugna pacos*) llevadas de Chile a Nueva Zelandia, un 38% de ellas presentaban anticuerpos contra el serovar *pomona*, indicando en este estudio que se debe ampliar la difusión acerca de leptospirosis en otras especies como las alpacas (Hill y Wyeth, 1991).

Estudios realizados en Valdivia, en 400 perros atendidos en clínicas veterinarias, demuestran que en la zona, la seroprevalencia de un 14,8% es relativamente baja, en contraste con el único

estudio realizado en la zona (hasta ese entonces) por Barrientos (1966) donde tomo muestras a 156 perros, arrojando una seroprevalencia del 52,54%, pero relativamente similar a un estudio hecho el año 2002 por Ramírez y colaboradores, quienes obtuvieron un 10% de positividad, teniendo 50 muestras en total (Silva y Riedemann, 2007) .

En el año 2011, Tuemmers y colaboradores, llegaron a la conclusión que, de una población estudiada de perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, 172 machos y 228 hembras, representando 43 y 57% de la población, respectivamente. El rango de edad de los animales estudiados fue de 2 meses a 12 años con una mediana de 3 años. De 400 animales evaluados, 85 resultaron positivos, calculándose la prevalencia de leptospirosis en 21,3%. Del total de machos estudiados, 21,5% (n: 37) resultaron positivos, mientras que 21,2% (n: 48) del total de hembras, resultaron seropositivas, no encontrándose diferencias significativas entre ambos. Respecto a la edad, se observaron diferencias donde la mayor seropositividad se presentó en animales entre 5 y 8 años de edad, con 24,07%, mientras la menor positividad se observó en cachorros (menores a 1 año) con 20,4%.

Se han utilizado varios métodos de diagnóstico, entre los cuales es posible mencionar el cultivo, la Prueba de aglutinación Microscópica (MAT), Inmunoensayo enzimático (ELISA), Microscopía de campo oscuro y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

a) Cultivo. Se realiza a partir de muestras de sangre, orina o tejidos, o por la demostración de la presencia de leptospiras en los tejidos usando anticuerpos conjugados con marcadores de fluorescencia. Desafortunadamente las leptospiras crecen lentamente (dependiendo del serovar, tarda entre 1 y 2 semanas para obtener resultados positivos) y para el momento que sean identificadas en el cultivo, el paciente tendrá anticuerpos detectables por serología. Por esta razón, el cultivo no contribuye al diagnóstico rápido en la fase temprana de la enfermedad. Sin embargo, el cultivo puede ser un método útil para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que mueren muy rápido después de la aparición de los síntomas y antes que los anticuerpos sean detectables (WHO, 2003). El personal de laboratorio que trabaja con bacterias, está altamente expuesto a la infección con el agente (WHO, 2003), por lo que se deben tener las precauciones de un laboratorio con un nivel de bioseguridad 2. En Chile, el cultivo e identificación de esta bacteria lo realiza el SAG.

b) Prueba de aglutinación Microscópica (MAT). Método indirecto que corresponde a la prueba serológica más utilizada. Determina los anticuerpos aglutinantes en el suero de un paciente mediante la mezcla con suspensiones de bacterias vivas. Los anticuerpos presentes en el suero hacen que las bacterias se adhieran unas a otras, formando agregados (aglutinación). Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG. La MAT permanece como prueba de referencia y es usada para detectar también el título de anticuerpos (WHO, 2003). Las desventajas importantes son el trabajo con leptospiras vivas y su mantención. Además, la prueba es técnicamente exigente y consume mucho tiempo. No encontrar títulos o un bajo título en la MAT no excluye la leptospirosis en estas circunstancias. Los títulos detectables de anticuerpos aparecen en la sangre de 5-10 días después de la aparición de la enfermedad, aunque algunas veces tardan más, más aún si se implementó tratamiento con antibióticos. Como medida de bioseguridad, la utilización de antígeno muerto es considerado seguro para el operador o quien realiza el estudio (WHO, 2003). En Chile, uno de los laboratorios que realiza esta técnica, es el del Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile (Tapia, 2014).

c) El Inmunoensayo Enzimático (ELISA). Es una prueba serológica que sólo detecta anticuerpos género específicos y no es apropiada para la identificación del serogrupo o serovar. Las pruebas de ELISA son de uso común y varios ensayos están disponibles; estas pruebas pueden realizarse con kits comerciales o con antígenos hechos de obtención propia. La presencia de anticuerpos IgM puede indicar una leptospirosis actual o reciente, pero debe recordarse que los anticuerpos IgM pueden permanecer detectables por varios años (WHO, 2003). En Chile, el diagnóstico mediante esta prueba es realizado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

d) Microscopía de campo oscuro. Método directo, donde las leptospiras se observan como microorganismos delgados, en espiral y de rápidos movimientos en fluidos tales como el medio de cultivo, sangre u orina. Si bien la microscopía de campo oscuro es particularmente útil para observar las leptospiras en cultivo, sobre todo cuando están presentes en gran número y para

observar la aglutinación en la MAT, es exigente en cuanto a la técnica, dado que reconocer las leptospiras es difícil, en particular cuando están presentes en poca cantidad. Artefactos, como trazas de fibrina en sangre, son fácilmente confundidos con leptospiras. También genera falsos positivos (WHO, 2003).

e) PCR. Corresponde a un método de amplificación de fragmentos de ADN específicos del genoma de *Leptospira*, en muestras clínicas, como por ejemplo sangre (WHO, 2003). En este método, se utilizan muestras de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido (ante o *post-mortem*), y el ADN amplificado es detectado en geles de agarosa. Dentro de los primeros días de la enfermedad, la única prueba específica y sensible es el PCR. En esta etapa, es posible un diagnóstico rápido. En países de escasos recursos, el costo y los requerimientos para equipamiento especial y experiencia técnica, crean una barrera que limita su uso (Musso y La Scola, 2013).

En Chile, el SAG realiza PCR como método de detección de *Leptospira*, al igual que otros estudios realizados, utilizando como blanco de detección el gen ribosomal 16S con el cual se registró un 50% de individuos positivos a *Leptospira spp* por primera vez en mustélidos en Chile (Núñez, 2013) o el gen *secY* en *L. interrogans* mediante PCR en ganado bovino presente en el sur de Chile (Salgado *et al.*, 2015).

La diferencia principal entre los estudios anteriores y lo que esta Memoria de Título plantea, además de la utilización de una PCR convencional para la detección del gen de la proteína LipL32, es la diferenciación entre los 4 serovares de *L. interrogans*, mediante la acción de una endonucleasa de restricción, la *BccI*. La selección de esta enzima se llevó a cabo gracias al programa de acceso libre Neb cutter™. Según estudios comparativos entre métodos de diagnósticos, se llegó a la conclusión de que la detección de *L. interrogans* teniendo como blanco de detección el gen *lipl32*, tiene una sensibilidad de un 98,68% y una especificidad de un 98,25%, valores superiores a los registrados por MAT (82,43% de sensibilidad y 94,92 % de especificidad), considerado Gold standar para la detección (Gökmenet *al*, 2016). Se buscó que este amplicón de 480 pb fuera digerido por la enzima de restricción *BccI* con el objeto de diferenciar entre *L. interrogans* serovar *Canicola* (LsC; AJ580493.1), *L. interrogans* serovar

Pomona (LsP; EU871716.1), *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* (LsI; AB094433.2) y *L. interrogans* serovar *grippotyphosa* (LsG; JN886738.1). Cabe hacer notar que la enzima de restricción escindió ADN de hebra doble concomitantemente con la detección de una secuencia de bases específica. Así, la enzima *BccI* -aislada de *Bacteroides caccae*- reconoce la secuencia de nucleótidos: CCATCNNNNNN (Genbank, 2015).

Finalmente, la elección de gen *lipL32* -como blanco de detección- también constituyó una diferencia con estudios anteriores: la proteína LipL32, la cual se encuentra en mayor abundancia en las leptospiras que son clasificadas como patógenas, representa casi 50% del total de proteínas que se encuentra en la membrana externa de la bacteria (Cullen *et al.*, 2002). El gen de la lipoproteína, además, es el más conservado entre las especies patógenas (Hoke *et al.*, 2008). Si bien no se conoce exactamente la función de LipL32, ha mostrado inducir a las citoquinas participantes de la inflamación y estimular la producción de matriz extracelular en cultivos de células epiteliales de túbulos renales a través de la vía TGF-beta1/Smad dependiente. Estas reacciones inflamatorias requieren de receptores Toll-like 2 (TLR2) en vez de TLR4 en cultivos de células de túbulos renales (Yang *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

Objetivo general

Implementar un método diagnóstico diferencial de cuatro serovares de *L. interrogans* mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso de una endonucleasa de restricción.

Objetivos específicos

1. Detectar mediante PCR el gen *LipL32* en cepas de *L. interrogans*.
2. Determinar la utilidad de la enzima *BccI* para diferenciar entre 4 serovares de *L. interrogans*: *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *grippityphosa*

MATERIALES Y METODOS

La realización del trabajo se efectuó tanto en los laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET de la Universidad de Chile como en el Laboratorio de *Leptospira* del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria, del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG).

Implementar el protocolo de PCR convencional para la detección del gen *lipL32* presente en *Leptospira interrogans*.

Se utilizaron cepas puras obtenidas de cultivos de la unidad de Leptospirosis del laboratorio de bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero, de los siguientes serovares: *Leptospira interrogans* serovar *canicola* (LISC), *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (LISI), *Leptospira interrogans* serovar *pomona* (LISP) y *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa* (LISG). Como control negativo se utilizó ADN de *Salmonella Typhimorium*. Como control de reactivos se usó agua libre de nucleadas (ALN).

Obtención del ADN de *Leptospira*. La extracción de ADN se realizó mediante la utilización de un kit comercial (High pure PCR template preparation kit Roche®). Dentro de un gabinete de flujo laminar, a 0,5 ml de medio de cultivo abundante con un serovar de *L. interrogans*, se agregó 400 µL de buffer de lisis del kit de extracción, además de 50 µL de proteinasa K incluida en el kit. Los tubos se incubaron 1 h a 55°C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos, para luego ser extraídos 200 µL de sobrenadante de cada muestra y se traspasó a un tubo limpio de 2 ml. Después de realizar los pasos anteriores, el proceso se realizó sobre mesón: se utilizó el procedimiento descrito en manual del kit comercial. A 200 µL de muestra se le agregó 200 µL de DNA binding buffer. Se mezcla bien. Se incubó 10 minutos a 70°C. Se agregaron 100 µL de isopropanol. Se mezcló bien y la mezcla se agregó en un tubo de colección más un tubo con filtro. Se centrifugó a 8000 g por 1 minuto. Se agregó 500 µL de buffer de remoción de inhibidores. Se centrifugó a 8000 g por un minuto y luego se descartó el sedimento con tubo de colección. Se agregó 500 µL de buffer de lavado. Se centrifuga a 8000 g por 1 minuto. Se descartó sedimento con tubo de colección. Se agregaron 500 µL de buffer de lavado. Se centrifugó a 8000 g por 1 minuto. Se descartó sedimento con tubo de colección.

Se agregaron 500 μ L de buffer de lavado. Se centrifugó a 8000 g por 1 minuto. Se centrifugó a 13000 g por 10 segundos y se descartó el sedimento con tubo de colección. En un nuevo tubo, se insertó tubo con filtro, se agregó buffer de elusión (70°C). Se centrifugó a 8000 g por 1 minuto y se obtuvo ADN purificado.

Partidores. En la técnica de PCR, se utilizaron los partidores JB1: 5'-ATGTTTGGATTCTGCCGTA-3' y JB2: 5'-GGCTCACACCTGGAATACCT-3' generados por el programa *Oligoperfect Design (Invitrogen, ltd.)* de acceso *on line* gratuito para la obtención de un amplicón de 480 pares de bases. El diseño de los partidores se basó en el alineamiento de los cuatro serovares a estudiar y la elección de la zona genómica que involucra las diferencias nucleotídicas encontradas según el programa *on line* gratuito Clustal Omega (Anexos 1 y 2). La reconstitución de cada uno de los partidores con agua libre de nucleasas, condujo a la obtención final de ambos partidores a la concentración de 1 μ M.

Mezcla de la reacción: Se utilizó 15 μ L de la solución Master Mix Go taq® Green 2x PROMEGA M712b, 5 μ L del ADN molde y 5 μ L de cada partidor específico, llegando a un volumen final de 30 μ L.

Amplificación del ADN: La técnica de PCR contempló una etapa de desnaturalización del ADN, seguido de una etapa de alineamiento de los partidores y una etapa final de elongación para terminar un ciclo. Las muestras fueron llevadas al termociclador Apollo® y se sometieron a una etapa de desnaturalización del ADN a 94°C por 30 segundos, una etapa de alineamiento de los partidores a 55°C por 30 segundos y una etapa de elongación, a 72°C por 30 segundos, para completar un ciclo, requiriendo de 30 ciclos para realizar el método. Transcurrido 30 ciclos se procedió a visualizar el producto amplificado.

Visualización del producto amplificado: Se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler ®) en buffer Tris-borato (90 Mm Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. En cada pocillo se cargaron 5 μ L del producto de PCR y los controles respectivos. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 90 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder Maestrogen®, que va desde 100 a 3000 pares de bases. Luego de la electroforesis, el gel se incubó en Bromuro de Etidio (0,5 μ g/mL) (Fermelo ®) durante 40 minutos y posteriormente se colocó en un transiluminador de luz

ultravioleta (Transiluminator UVP ®). Finalmente, el gel se fotografió para obtener registro de los resultados.

Obtención un patrón de digestión típico para cada serovar de *Leptospira interrogans*.

Cada fragmento de ADN obtenido fue digerido con la enzima de restricción *BccI*. Para esto, previamente, en un tubo de PCR, se preparó un “master mix” que contenía 15 µL de agua libre de nucleasas, 5 µL del buffer de digestión, y 5 µL de la enzima de restricción, generando un volumen final de 25 µL. Se tomaron 4 tubos más de PCR, a cada uno de los cuales se le colocó 5 µL del master mix preparado y se colocaron además 5 µL de cada resultado de PCR en cada uno de los 4 tubos. Para poner en marcha la digestión, se llevó los 4 tubos a una estufa a 37°C durante 1 hora y 20 minutos, y para poder inactivar la enzima, estos tubos fueron llevados a un baño a 65°C, durante 20 minutos. La visualización de los fragmentos digeridos y sin digerir fue realizada de la misma forma mencionada anteriormente.

La enzima *BccI* (New England BioLabs ® Inc.) fue adquirida por el Departamento de Medicina Preventiva para la realización del trabajo experimental de esta memoria.

Bioseguridad. Como normas de bioseguridad se consideraron el acceso limitado a las instalaciones, uso de delantal limpio y cerrado, utilización de material limpio y la adecuada eliminación de desechos. Respecto al procedimiento de PCR y posterior electroforesis se debió utilizar guantes de látex tanto para evitar contaminación de la muestra, como para manipular sustancias como el bromuro de etidio, el cual tiene propiedades mutagénicas. Al utilizar el transiluminador se utilizaron gafas con filtro UV y una placa de acrílico ubicada entre el equipo y la persona que visualizó el gel. Finalmente, el gel y los guantes utilizados fueron desechados para su posterior incineración. Es importante señalar -además- que el ADN de la bacteria *Salmonella* Typhimurim fue obtenida del laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y en ningún momento se estuvo en contacto con la bacteria viva.

RESULTADOS

a) Detección mediante PCR del gen *LipL32* en cepas de *L. interrogans*.

Como resultado de la técnica de la PCR y de la utilización de los partidores diseñados *In Silico* (Figura 1), en cada carril asignado a las muestras se observó una banda única de alrededor de 500 pb. No se observaron bandas en los carriles asignados al control negativo ni en el carril correspondiente al control de reactivos.

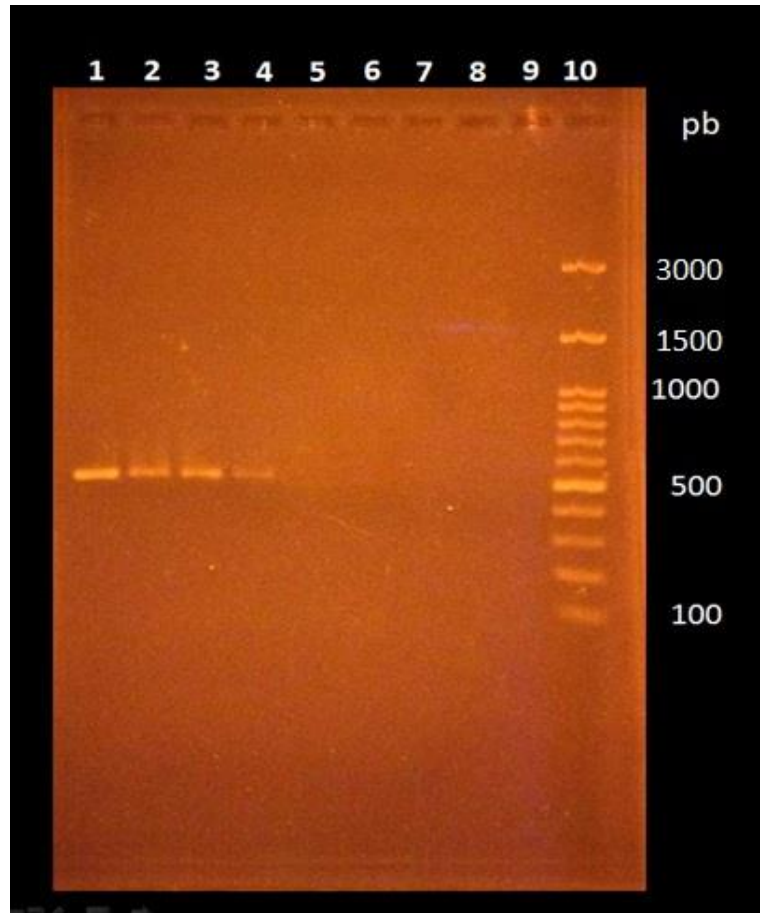


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen lipL32 para *Leptospira interrogans*. Carril 1: *Leptospira interrogans* serovar *canicola*. Carril 2: *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. Carril 3: *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. Carril 4: *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa*. Carril 5: control negativo. Carril 6: control de reactivos. Carriles 7, 8,9: vacíos Carril 10: marcador de tamaño molecular

b) Determinación de la utilidad de la enzima *BccI* en *L. interrogans* para diferenciar entre los serovares *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *grippotyphosa* de *L. interrogans*.

Luego de la digestión de los fragmentos de ADN productos de la técnica de PCR empleada, se pudo observar en carril un fragmento de aproximadamente 300 pb. (fig. 2)

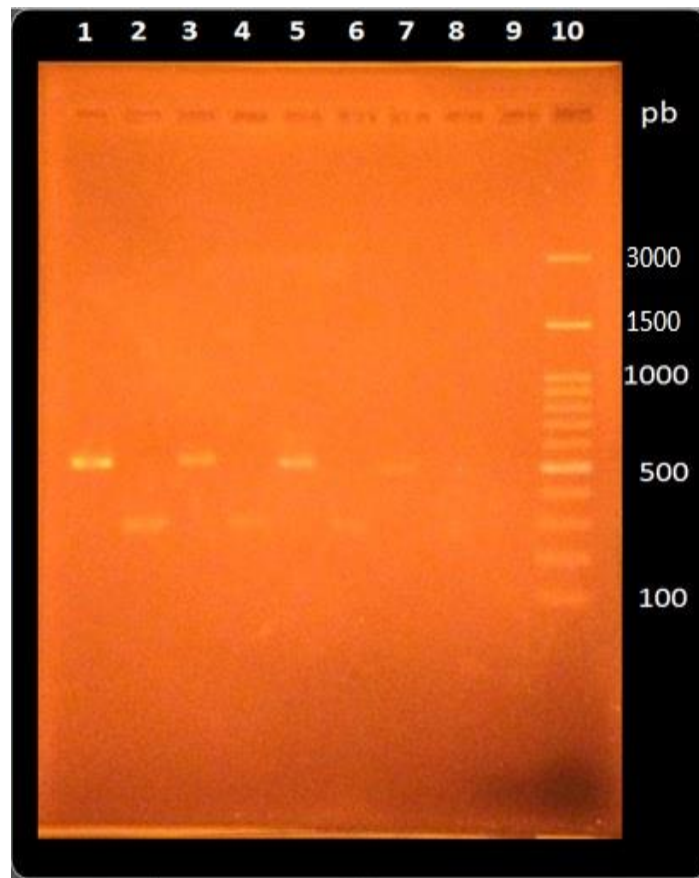


Figura 2: Gel de agarosa al 2%. Digestión con *BccI* para *Leptospira interrogans*. Carril 1: *Leptospira interrogans* serovar *canicola* (PCR). Carril 2: *Leptospira interrogans* serovar *canicola* (restricción). Carril 3: *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (PCR). Carril 4: *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (restricción). Carril 5: *Leptospira interrogans* serovar *pomona* (PCR). Carril 6: *Leptospira interrogans* serovar *pomona* (restricción). Carril 7: *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* (PCR). Carril 8: *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* (restricción). Carril 9 vacío. Carril 10: marcador de tamaño molecular

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, el protocolo de PCR implementado con los partidores diseñados *in silico*, fue capaz de detectar fragmentos únicos y del tamaño esperado (≈ 500 pb), lo cual constituye ciertamente un aporte a la detección general de *Leptospira*. Sin embargo, al realizar la digestión enzimática con *BccI* no se obtuvo el patrón esperado, pues se observaron bandas únicas de alrededor de 300 pb en cada uno de los fragmentos digeridos y productos del PCR.

Una posible explicación a estos resultados podría ser la posibilidad de la presencia de mutaciones silentes, aquellas en que cambia una base de un codón, pero no el aminoácido que determina, o aquellas que cambian un aminoácido sin afectar la actividad de la proteína codificada por el gen (Alberts *et al.*, 2010). Esto explicaría la diferencia con las secuencias obtenidas del Genbank y que *a priori* señalaban que el uso de *BccI* era el adecuado. De existir una mutación en el gen que codifica para la LipL32 en el sitio de restricción, se explicaría la escisión de la doble hebra por parte de la endonucleasa en el caso de *LISC*, que corresponde un resultado no esperado. Sin embargo, esta posibilidad solo sería resuelta al secuenciar los fragmentos obtenidos en el PCR, es decir los 480 pares de bases obtenidos en cada caso.

Así, de obtener una secuencia nucleotídica compatible con la obtenida mediante el Genbank se podrá definir otro escenario a considerar: confusión de muestras o fallas en los tiempos de incubación en Bromuro de Etidio al considerar una muestra diluida en la segunda electroforesis.

El uso de enzimas de restricción en la detección diferencial entre serovares de *Leptospira* ha sido reportada recientemente, pero utilizando 2 o más enzimas de restricción tales como *BasI*, *FokI*, *HaeIII*, *Hyp8I*, y *TaqII* para la digestión de los amplicones generados por PCR (Wajjwalku *et al.*, 2015). Esto, representa una diferencia importante con nuestro trabajo en cuanto a usar dos o más enzimas para la diferenciación de los serovares.

Actualmente, se han descrito otros genes como blancos de detección de *Leptospira*: el gen *flaB* (Wajjwalku *et al.*, 2015) o el gen de la subunidad β de la RNA polimerasa (Jung *et al.*, 2015), lo que aumenta la cantidad de blancos para la detección por PCR y posterior digestión con una, o con varias enzimas de restricción.

En este sentido, una proyección de este trabajo sería el uso de otro gen blanco. Sin embargo, se ha descrito que el gen *LipL32* es el más conservado en las especies patógenas de *Leptospira*, lo que hace suponer que tiene un carácter infectivo, aun cuando no está absolutamente claro su rol (Murray, 2013).

En definitiva, frente a los resultados obtenidos, se puede proponer lo siguiente:

- Estudio y utilización de una o varias enzimas de restricción distintas de *BccI*, como las mencionadas anteriormente u otras como: *SexAI*, *CvikI-1*, *MwoI* y *BfuCI*, para la realización de la escisión de los amplicones obtenidos con el método PCR de *lipL32*.
- Secuenciación del producto de PCR, compararlo con la información del GenBank® y verificar lugares de posibles mutaciones silentes.

CONCLUSION

Hasta ahora, la detección molecular de *Leptospira interrogans* es una realidad, pues queda demostrado mediante el uso del protocolo de PCR ya descrito. En deuda queda la detección diferencial de los serovares, que según la literatura y el uso del programa *on line* NEBcutter permitía aventurar un resultado muy alentador con el uso de *BccI*. La realidad es otra y se debe seguir en la senda de obtener el resultado óptimo: la diferenciación por serovares.

BIBLIOGRAFÍA

ADLER, B. 2014. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol.* 172:353-358.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140:287-296.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. *Biología Molecular de la Célula.* 5ª edición. Ω Ediciones. Barcelona, España. 1602 p.

ANDRE-FONTAINE, G.; AVIAT, F.; MARIE, J.; CHATRENET, B. 2015. Undiagnosed leptospirosis cases in naive and vaccinated dogs: Properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32. *Comp Immunol Microb.* 39: 1-8.

BARRIENTOS, J. 1966. Contribución al estudio de la leptospirosis canina en el área rural de la provincia de Valdivia. Memoria de titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.

CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 2005. Decreto Supremo N°158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 10 de Mayo de 2005.

CLUSTAL OMEGA. Multiple sequence alignment. [en línea] <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>> [consulta: 10-11-2015]

CULLEN, P.A., CORDWELL, S.J., BULACH, D.M., HAAKE, D.A., ADLER, B. 2002. Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun.* 70 2311–2270.

CUSTOM PRIMERS - OLIGOPERFECT™ DESIGNER. [en línea] <<https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716&icid=fr-oligo-6?CID=fl-oligoperfect>> [consulta: 10-11-2015]

GENBANK. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> [consulta: 10-12-2015]

GÖKMEN, T.; SOYAL, A.; KALAYCI, Y.; ÖNLEN, C.; KÖKSAL, F. 2016. Comparison of 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR and OmpL1-PCR methods in the diagnosis of leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 58: 64.

HILL, I.; WYETH, T. 1991. Serological reaction against *Leptospira interrogans* serovar in alpacas after vaccination, *N. Zealand Vet. J.* 39: 32- 33.

HOKE, E.; EGAN, S.; CULLEN, P.; ADLER, B. 2008. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira spp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*, 76(5), 2063–2069.

JUNG, L.; QUARESMA, M.; GEESSIEN, E.; CANTINI, A. 2015. Identification of *Leptospira* serovars by RFLP of the RNA polymerase beta subunit gene (*rpoB*). *Braz. J. Microbiol.* 46(2):465-476.

KO, A.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.*7(10):736-747.

MURRAY, G. 2013. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet. Microbiol.* 162: 305-314.

MUSSO, B.; LA SCOLA D. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect.* 46(4):245-52

NEBcutter. New England BioLabs. Inc. [en línea] <<http://www.neb.com>>[consulta: 10-12-2015]

NUÑEZ, C. 2013. Detección de *Leptospira sp.* en muestras de riñón y sangre del mustélido *Neovison vison*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 23p.

OLMO, F.; PEÑAS, C.; SOJO, J.; MUNIÁIN, M. 2014. Leptospirosis. *Medicine.* 11(51):3003-3008

RIVERA-RAMÍREZ, P.; ISLAS, A.; LÓPEZ, J.; MERINO, V.; MORA, G.; TARDON, R.; SALAZAR, C.; TAJ-TAJ, F. 2002. Resúmenes del XII Congreso de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile.

RUIZ, A. 1938. Contribución al estudio de las enfermedades parasitarias humanas transmitidas por las ratas de Concepción. Tesis para optar al título de Médico-Cirujano de la Universidad de Chile. 27 p.

SALGADO, M.; BARBARA OTTO, B.; MORONI, M.; SANDOVAL1, E.; REINHARDT, G.; BOQVIST, S.; ENCINA, C.; MUÑOZ-ZANZI, C. 2015. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo prajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile. *BCM Vet Res.* 11:1-4

SILVA, R.; RIEDEMANN, S. 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. med. Vet.* 39(3): 269-274.

TAPIA C. 2014. Frecuencia de presentación de sueros reaccionantes a *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpeterseni* en una población de equinos de tiro urbano de la región Metropolitana de Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 25p.

TUEMMERS, C.; LÜDERS, C.; ROJAS, C.; SERRI, M.; ESPINOZA, R.; CASTILLO, C. 2011. Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco. Rev Chilena Infectol. 30(3):252-257.

WAJJWALKUL, W.; SUKMAK, M.; AMAVISIT, P.; SUKPUARAM, T.; LA-ARD, A. 2015. Molecular Characterization Of *Flab* For *Leptospira* Identification. SoutheastAsian J Trop Med Public Health. 46(2):262-467.

WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. [en línea] <http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>[consulta: 13-08-2015]

XIREN, SHUANG; FU, GANG; JIANGK, XIU-GAO. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genomes sequencing. Nature 422: 888-892

YANG, M.; CHUAN, Y.; HSING S.; LIN, T.; FANG, L.; HAO, H.; CHUNG, Y.; CHANG, Y.; JU, Y.; CHIEH, C.; LONG, R.; WEI, C. 2016. Leptospiral outer membrane protein LipL32 induces inflammation and kidney injury in zebra fish larvae. SciRep 6: 1-12.

ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S. 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. Arch. med. vet.31(2):151-156

ZUNINO, E.; PIZARRO, R. 2007. Leptospirosis: Puesta al día. Rev. Chil. Infectol. 24(3): 220-226.

ANEXOS

Anexo 1

Secuencias nucleotídicas de los cuatro serovares de *Leptospira interrogans* a detectar (numero de acceso Genbak: serovar. sigla).

>AJ580493:Leptospira interrogans serovar canicola: LISC
ATGAAAAAAGCTTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGC
CTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTCCCTACGGATCTGTGA
TCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTT
GGATTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACAGGCGACGGAGACTTAG
TAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGT
CGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAAATGGACGATGATGATAATGGTGACGATA
CTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGA
AAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGAT
CTTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGC
AAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA

>AB094433.2:Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae: LISI
ATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAAAC
GAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTA
GTGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCA
ACAGGCGAAATCGGTGAGCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCA
CATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTGCGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCA
GTTCAAAAATTTGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATC
AAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATT
TCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGT
GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCT

>JN886738.1:Leptospira interrogans serovar Grippityphosa: LISG
ATGAAAAAAGCTTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGC
CTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTG
ATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTT
TGGATTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACAGGCGATGGAGACTTA
GTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATG
TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTTGGACGATGATGATGATGGTGACGAT
ACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGACCTG
AAAAACATCGACTAAAAAAGCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGAA
TCTTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTG
CAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA

>EU871716.1: Leptospira interrogans serovar Pomona: LISP
ATGAAAAAAGCTTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGC
CTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTG
ATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTT
TGGATTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACAGGCGACGGAGACTTA
GTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATG
TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGTCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTTGGACGATGATGATGATGGTGACGAT
ACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTG
AAAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGAA
TCTTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTG
CAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA

Anexo 2

Alineamiento multiple de secuencias (clustal Omega)

```
LISC ATGAAAAAATTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGT
LISG ATGAAAAAATTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGT
LISI -----ATTACCGCTTGT
LISP ATGAAAAAATTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGT
*****

LISC GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC
LISG GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC
LISI GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC
LISP GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC
*****

LISC CCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTAC-TCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC
LISG CCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC
LISI CCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC
LISP CCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC
*****

LISC GGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAAAGCATA
LISG GGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAAAGCATA
LISI GGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAAAGCATA
LISP GGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAAAGCATA
*****

LISC TATCTCTATGTTGGATTCCGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCA
LISG TATCTCTATGTTGGATTCCGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCA
LISI TATCTCTATGTTGGATTCCGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCA
LISP TATCTCTATGTTGGATTCCGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCA
*****

LISC ACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT
LISG ACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGATGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT
LISI ACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT
LISP ACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT
*****

LISC ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATG
LISG ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATG
LISI ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATG
LISP ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATG
*****

LISC TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCCAGTTCAAAAATTG
LISG TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCCAGTTCAAAAATTG
LISI TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCCAGTTCAAAAATTG
LISP TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGTCAAAGCTGCGAAAGCAAACCCAGTTCAAAAATTG
*****
```

```

LISC GACGATGATGATAATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT
LISG GACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAGTACAACCTCT
LISI GACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT
LISP GACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT
*****

LISC CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC
LISG CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGACCTGAAAAACATCGAT
LISI CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC
LISP CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC
*****

LISC ACTAAAAAATCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGT
LISG ACTAAAAAATCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGT
LISI ACTAAAAAATCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGT
LISP ACTAAAAAATCTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGT
*****

LISC GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCCAGGT
LISG GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCCAGGT
LISI GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCCAGGT
LISP GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCCAGGT
*****

LISC GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA
LISG GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA
LISI GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA
LISP GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA
*****

LISC GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA
LISG GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA
LISI -----
LISP GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA

```

Secuencia candidato para diseño de partidores (consenso)

```

GAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTA
GTGATGGAAAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCA
ACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCA
CATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCA
GTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATC
AAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAATCTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATT
TCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCCAGGT
GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCT

```

Partidores a utilizar según programa Oligoperfect®

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Soporte para Pedidos

Sign In

Orden Rápida



The primers designed for your target sequence are displayed below it. Use the scrollbar to the right of the primer list to view them. To see where the primers will anneal to the target sequence, click on the "Highlight Target Sequence" button below each set. To change the Primer Sequence or 5' Addition, click on the edit icon to the left of each sequence and an editing window will appear. To select a primer for purchase, click on the box to the left of the Primer Name.

Sequence Name:

leptospira interrogans

Target Sequence:

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1      CTATCTCTATGTTTGGATTCTGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTA
101     AGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACC
201     AAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAAACAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATAATGGTGACGATACTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACTC
301     TCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCAAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTTTTCACAGAAATTTCT
401     TTCACTACTACAAACAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACT
501     CAAATCCTGAA
    
```

Rank: 1	Product Length: 480	Product Region: 9-488		
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> leptospira interrogans 1 F	45.00	FWD	20	60.33
<input type="checkbox"/> leptospira interrogans 1 R	55.00	REV	20	59.02
5' Addition	Primer Sequence			
	A T G T T T G G A T T C C T T G C C G T A			
	G G C T C A C A C C T G G A A T A C C T			
<input type="button" value="Highlight Target Sequence"/>				

Anexo 3: Secuencias utilizadas para detectar cortes por *BccI* (segun programa NEBcutter).

>AJ580493.1:248-727 *Leptospira interrogans* serovar *canicola*
 ATGTTTGGATTCTGCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGACGGAG
 ACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAA
 GAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAAACAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATAATGGTG
 ACGATACTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCAAAAATCTTTGACG
 ATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGA
 AAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTTCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCC

>AB094433.2:248-727 *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*
 CCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAAGAAAAATCAA
 TGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAA
 AACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTA
 GAATCAAGATCCCTAATCCTCAAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTTTACA
 GAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTC
 CAGGTGTGAGCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAGCTATCGCTG

```
>EU871716.1:248-727 Leptospira interrogans serovar Pomona
ATGTTTGGATTTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGGCAGCGAG
ACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGGTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAA
GAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGTCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTG
ACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACG
ATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCTACAAAACCAGGTGAAGTGA
AAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCC
```

```
>JN886738.1:248-727 Leptospira interrogans serovar Grippyphosa
ATGTTTGGATTTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGGCAGTGGAG
ACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGGTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAA
GAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTG
ACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACG
ACCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCTACAAAACCAGGTGAAGTGA
AAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCC
```

Anexo 4: Resultados esperados de digestión de amplicones con *BccI* segun NEBcutter

- LISC: no corta;
- LISI : 2 fragmentos: 192 y 288 pb
- LISG: 3 fragmentos: 72, 168 y 240 pb;
- LISP: "2 fragmentos": 240 pb

