



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira spp* DE FUENTES DE AGUA  
MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DE MÚLTIPLES LOCI (MLST) DE ZONAS  
ENDÉMICAS DEL PERÚ 2019 Y 2022

**Línea de investigación:**

**Microbiología, parasitología e inmunología**

Trabajo académico para optar el título de segunda especialidad  
profesional en Genética y Biología Molecular

**Autora:**

Delgado Baldeon, Mercedes Angelica

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

**Jurado:**

Robles Román, Margarita Elena

Rodrigo Rojas, María Elena

Sáenz Flores, Gloria María

**Lima - Perú**

**2024**



# Caracterización molecular de *Leptospira* spp de fuentes de agua mediante la Secuenciación de Múltiples Loci (MLST) de zonas endémicas del Perú 2019 y 2022

## INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

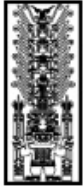
PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 1 | <a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a><br>Fuente de Internet                       | 4%  |
| 2 | <a href="http://scielo.sld.cu">scielo.sld.cu</a><br>Fuente de Internet   | 1%  |
| 3 | <a href="http://revistacta.agrosavia.co">revistacta.agrosavia.co</a><br>Fuente de Internet                       | 1%  |
| 4 | <a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a><br>Fuente de Internet   | 1%  |
| 5 | Submitted to Universidad Nacional de Colombia<br>Trabajo del estudiante  | 1%  |
| 6 | <a href="http://id.scribd.com">id.scribd.com</a><br>Fuente de Internet   | 1%  |
| 7 | <a href="http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe">revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe</a><br>Fuente de Internet | 1%  |
| 8 | <a href="http://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a><br>Fuente de Internet                   | <1% |



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira spp* DE FUENTES DE AGUA  
MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DE MÚLTIPLES LOCI (MLST) DE ZONAS  
ENDÉMICAS DEL PERÚ 2019 Y 2022**

Línea de investigación:

Microbiología, Parasitología e Inmunología

Trabajo Académico para obtener el Título de

Segunda Especialidad Profesional en Genética y Biología Molecular

Autora

Delgado Baldeon, Mercedes Angelica

Asesor

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado

Robles Román, Margarita Elena

Rodrigo Rojas, María Elena

Sáenz Flores, Gloria María

Lima - Perú

2024

## INDICE

|   |      |
|---|------|
| Resumen.....  | vii  |
| Abstract.....   | viii |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1.1. Descripción del Problema .....   | 1    |
| 1.2. Antecedentes .....   | 4    |
| 1.3. Objetivos.....   | 6    |
| 1.3.1. Objetivo General.....  | 6    |
| 1.3.2. Objetivos Específicos.....   | 6    |
| 1.4. Justificación e importancia .....  | 6    |
| 1.5. Impactos esperados del trabajo académico .....                               | 7    |
| II. METODOLOGÍA .....   | 9    |
| 2.1. Obtención de muestras de agua y cultivo de <i>Leptospira</i> .....           | 9    |
| 2.2. Extracción de ADN y amplificación mediante el PCR en tiempo real (qPCR)..... | 11   |
| 2.3. PCR y Secuenciación mediante MLST.....                                       | 12   |
| 2.4. Análisis de secuencias.....  | 13   |
| 2.5. Análisis filogenético .....  | 14   |
| III. RESULTADOS.....  | 15   |
| 3.1. PCR en tiempo real .....   | 15   |
| 3.2. PCR- MLST .....  | 16   |

|  |    |
|--|----|
| 3.3. Análisis de secuencia de 7 genes por MLST .....                             | 19 |
| 3.4. Identificación de especies de <i>Leptospira</i> patógeno por filogenia..... | 21 |
| IV. CONCLUSIONES .....   | 24 |
| V. RECOMENDACIÓN.....  | 25 |
| VI. REFERENCIAS .....  | 26 |

**ÍNDICE DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. <i>Aislamientos de Leptospira spp procedentes de muestras de aguas superficiales de diferentes regiones del país del 2019 y 2022.....</i>   | 10 |
| Tabla 2. <i>Resultados de pruebas de laboratorio: cultivo, qPCR y especies y perfil alélico MLST de Leptospira spp de muestras de aguas de diferentes regiones del país 2019 y 2022.....</i> | 19 |
| Tabla 3. <i>Resultados de la prueba del PCR en tiempo real para Leptospira patógenos e intermedios determinados procedente de muestras de agua de los años 2019 y 2022.....</i>              | 22 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. <i>Base de datos MLST (<a href="http://pubmlst.org/leptospira/">http://pubmlst.org/leptospira/</a>)</i> .....  | 14 |
| Figura 2. <i>Resultados del qPCR para aislamientos de leptospiras de muestras de agua del 2019 y 2022</i> .....  | 15 |
| Figura 3. <i>Resultados de Electroforesi del PCR-MLST para el gen glmU de 650 pb</i> .....   | 16 |
| Figura 4. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen pntA de 621 pb</i> .....  | 16 |
| Figura 5. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen sucA de 640 pb</i> .....  | 17 |
| Figura 6. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen tpiA de 639 pb</i> .....  | 17 |
| Figura 7. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen pfkB de 588 pb</i> .....  | 18 |
| Figura 8. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen mreA de 719 pb</i> .....  | 18 |
| Figura 9. <i>Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen caiB de 650 pb</i> .....  | 19 |
| Figura 10. <i>Análisis filogenético de Leptospira patogénico procedentes de muestras de agua mediante el método de Neighbour-Joining en el Programa Mega XI.</i> ..... | 21 |

## Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar aislamientos de *Leptospira* spp procedentes de fuentes de agua de la Vigilancia Epidemiológica en Zonas Endémicas del Perú de los años 2019 y 2002, realizado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Bacterianas mediante pruebas como el cultivo microbiológico, PCR en tiempo real (qPCR) y Tipificación por Secuenciación de Múltiples Loci (MLST). El estudio fue descriptivo y la optimización de la metodología MLST fue con cepas de referencia de *Leptospira* spp patógenas y aplicados a 32 aislamientos de *Leptospira* spp, emplea una PCR de punto final seguido de secuenciación por el método Sanger de 7 genes “*Housekeeping*”, los cuales generaron un perfil alélico conocido como “*Sequence type*” (ST) o genotipo. De un total de 32 aislamientos analizadas, un 50% (16) fueron positivos al qPCR y de éstas un 25% (8) fueron determinados como la especie *L. interrogans* y ST13 (7/8) y un genotipo “nuevo”. Además, los resultados fueron enviados al curador de la página web: <https://pubmlst.org/organisms/leptospira-spp> para su registro y asignación del genotipo nuevo. El MLST permitió identificar un clon predominante en un 87.5% y un genotipo “ST nuevo” en aguas superficiales de uso humano en la región de Piura. Los datos obtenidos se enviaron a una base de *Leptospira* a nivel mundial permitiendo ubicar al Perú como la segunda región con mayores casos de leptospirosis en Latinoamérica, donde las variantes que existe en el Perú, permite establecer la relación filogenética entre las cepas y la disponibilidad de información para cualquier investigador.

**Palabras clave:** PCR en tiempo real, *Leptospira* spp, MLST, agua.



### Abstract

The present study aimed to characterize *Leptospira* spp isolates from water sources of the Epidemiological Surveillance in Endemic Zones of Perú in 2019 and 2002, carried out by the National Reference Laboratory for Bacterial Zoonoses through tests such as microbiological culture, real-time PCR (qPCR) and Multiple Loci Sequencing Typing (MLST). The study was descriptive and the optimization of the MLST methodology was with reference strains of pathogenic *Leptospira* spp and applied to 32 *Leptospira* spp isolates, using an endpoint PCR followed by sequencing by the Sanger method of 7 genes "Housekeeping", which generated an allelic profile known as "Sequence type" (ST) or genotype. Of a total of 32 isolates analyzed, 50% (16) were positive to qPCR and of these, 25% (8) were determined as the species *L. interrogans* and ST13 (7/8) and a "new" genotype. In addition, the results were sent to the curator of the website: <https://pubmlst.org/organisms/leptospira-spp> for registration and assignment of the new genotype. The MLST allowed to identify a predominant clone in 87.5% and a "new ST" genotype in surface waters for human use in the Piura región. The data obtained were sent to a global *Leptospira* database allowing Perú to be placed as the second región with the highest number of cases of leptospirosis in Latin América, where the variants that exist in Perú allow to establish the phylogenetic relationship between the strains and the availability of information for any researcher.

**Key words:** PCR in real time, *Leptospira* spp, MLST, water.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción del Problema

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa zoonótica desentendida y extendida a nivel mundial de importancia en salud pública, causada por el género *Leptospira* spp. Se encuentra frecuentemente asociada a lluvias e inundaciones y afecta a personas que viven en climas templados y tropicales, tanto en zonas rurales como urbanas (Bierque et al, 2020). A nivel mundial existen más de 1 millón de casos y 60 000 muertes anuales (Costa et al, 2015).

La epidemiología de la leptospirosis es compleja, pues la convierte en paradigma de una enfermedad de Una Salud (One Health) donde hay interrelación del agente microbiano, reservorio animal o ambiental y el hombre como hospedero accidental. Las bacterias habitan en los túbulos renales de los mamíferos crónicamente infectados (roedores y animales domésticos: canes, ganado vacuno, porcino, bovino, etc.) y luego, éstos eliminan las bacterias a través de la orina al medio ambiente en donde el hombre adquiere la infección de manera accidental (Levett, 2011). El riesgo de exposición humana más frecuente es por contacto entre la piel o las mucosas con fuentes de agua y suelo contaminados con *Leptospira* spp. La leptospirosis se conocía desde hacía mucho tiempo como una infección transmitida por el medio ambiente, incluso antes de que se pudiera identificar su agente etiológico (Ko et al., 2009) y se propuso el término de "reservorio ambiental" de leptospirosis para los suelos de regiones endémicas (Bierque et al., 2020; Thibeaux et al., 2020).

El espectro clínico de la leptospirosis es amplio, dado que en algunos casos se puede presentar como una forma subclínica sin síntomas aparentes, en otros se producen síntomas leves a los que se les llama casos agudos con cuadro febril y otros pocos desarrollan cuadros

más graves como los ictero-hemorrágicos (inmune) con compromiso hepático renal hasta producirse la muerte en un 40% (enfermedad de Weil) (Haake y Levett, 2015).

Tradicionalmente, se han identificado dos especies de la bacteria *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* como patógenas y no patógenas, respectivamente (Levett, 2001). Posteriormente, pruebas serológicas como Microaglutinación Test (MAT) han clasificado en 25 serogrupos con más de 300 serovares (Picardeau 2015). El género *Leptospira* se clasificaba hasta el 2018 en 22 especies en base a pruebas de hibridación del ácido desoxirribonucleico ADN-ADN, secuenciación del gen 16S ARNr, entre otras pruebas, en tres grupos filogenéticos de leptospiros: patógenas, intermedias y saprofitas (Fout et al., 2016). En el 2018, un estudio realizado por Thibeaux, en Nueva Caledonia-Francia en muestras de suelos identificaron 12 nuevas especies de leptospiros con metodología de Próxima Generación como el de Secuenciación del Genoma Completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) y Espectrometría de Masas MALDI (Thibeaux, et al., 2018). En el 2019, el equipo de Vincent en Canadá, identificaron 30 nuevas especies más de leptospiros a partir de muestras ambientales (suelo y aguas) de diferentes partes del mundo redefiniéndose la clasificación taxonómica actual de la leptospirosis, dando lugar de 22 en el 2018 a 64 en el 2019 (Vincent et al., 2019).

Existen reportes de supervivencia y virulencia de *Leptospira* saprofitas y patógenas de fuentes ambientales, en condiciones desfavorables en suelos húmedos, agua frías y ácidas y pobres en nutrientes aproximadamente dos años (Andre-Fontaine et al., 2015). La capacidad de *Leptospira* para vivir en diversos nichos ecológicos se debe sin duda a una diversidad de mecanismos, como los sistemas de transducción de señales, codificados por su gran genoma y que le permiten adaptarse y resistir a condiciones extremas (Fouts et al., 2016; Picardeau, 2017).

La técnica del MLST inicialmente fue desarrollada por Maiden *et al.* Se basa en una PCR, seguido de secuenciación de genes metabólicos “*housekeeping*” que son específicos de especie, estables y de lenta evolución, que se encuentren bajo presión de selección negativa. Las variaciones de los alelos en los diferentes *loci* son detectados al realizar el análisis de secuencias, permitiendo agrupar a microorganismos con genotipos idénticos como clones o microorganismos altamente relacionados como los Complejos Clonales (Maiden *et al.*, 1998). El MLST caracteriza aislamientos bacterianos mediante sus secuencias alélicas únicas, evalúa los cambios nucleótidos en siete genes de 450 a 500 pb para cada aislamiento (Feil *et al.*, 2004). A los diferentes alelos de cada gen (locus) se les asigna códigos numéricos y el conjunto de los mismos, define el perfil alélico o tipo de secuencia (ST), es decir, cada cepa está definida por los alelos de los siete loci (Boonsilp *et al.*, 2013; Feil *et al.*, 2004). La prueba MLST ha sido adoptada ampliamente para el estudio de epidemiología molecular, evolución bacteriana y biología de poblaciones de un gran número de especies microbianas y respaldado por una base de datos accesible al público y de fácil intercambio de resultados a nivel (Boonsilp *et al.*, 2013; Thaipadungpanit *et al.*, 2007) y representa el método molecular principal para el genotipado bacteriano y posee un alto poder discriminatorio entre cepas (Maiden *et al.*, 1998).

En nuestro país, existen estudios de tipificación molecular como la Electroforesis en Campo Pulsado (PEFG) que permite la caracterización de *Leptospira spp* hasta el nivel de serovar (Rivera *et al.*, 2012), otros estudios realizados por la Universidad de Cayetano Heredia con métodos como la secuenciación de gen ARNr 16S permite la identificación solamente de especies (Díaz Ortiz 2019; Ganoza *et al.*, 2010), sin embargo, no existe información respecto a una clasificación más allá de especies teniendo en cuenta lo muy variable que es el genoma, es decir, una clasificación en genotipos específicamente de muestras ambientales como es el agua, utilizando múltiples genes como el MLST.

En el Perú, la leptospirosis tiene un potencial endémico, principalmente en regiones tropicales, y subtropicales, donde es común eventos climatológicos extremos como las lluvias e inundaciones (Fenómeno El Niño) en diferentes zonas del país, favoreciendo la transmisión y constituyendo focos de infección muy importante, dado que el hombre por necesidad y como medio de subsistencia se encuentra en constante contacto con el agua, que muchas veces es considerado un vehículo para la propagación y diseminación de agentes microbianos como las leptospiras. En el presente estudio se realizó la caracterización molecular en especies y genotipos de aislamientos de leptospiras de muestras de agua mediante el MLST, proporcionando información valiosa que permitiría plantear medidas de prevención y control de la leptospirosis.

## 1.2. Antecedentes

Diversos estudios realizados en diferentes países a nivel mundial determinaron la utilidad del método MLST para caracterizar *Leptospira spp* de fuentes humanas y animales, no existen reportes como tal, para el análisis de aislamientos procedentes de fuentes de agua.

Uno de los primeros reportes del método MLST desarrollado por Ahmed *et al.*, en el 2006, fue para evaluar la robustez del método para la genotipificación de *Leptospira spp*, analizando un conjunto aislamientos y cepas de referencia procedentes de diferentes lugares geográficos y fuentes de infección, concluyendo que el método MLST para leptospiras es útil para estudios epidemiológicos, evolutivos y moleculares (Ahmed *et al.*, 2006). Por otro lado, Thaipadungpanit *et al.*, (2007) fueron otro grupo de investigadores los que estandarizaron el primer esquema de genotipificación específico para *L. interrogans* denominado Tipificación de Múltiples Loci (MLST) con más de 101 aislamientos de *Leptospira spp* que fueron aislados de un brote de leptospirosis ocurrido en Tailandia a lo largo de cinco años aproximadamente los años de 1999 al 2003, además identificaron a la especie *L. interrogans*, serovar Autumnalis

y al genotipo ST 34 como el más predominante (76%), siendo la causa principal de enfermedad humana en dicho brote, y destacaron ventajas del MLST, dado que la información obtenida puede ser comparado a través del internet. Otro estudio realizado por Boonsilp *et al.*, (2013), uno de los seguidores de Thaipadungpanit modificaron el esquema #1 plateada del MLST existente y ampliaron para caracterizar más especies patógenas, aparte de *L. interrogans* y *L. kirchneri*, logrando caracterizar en especies y genotipos de leptospiras a través del MLST.

Otros estudios en muestras ambientales, en las que hicieron referencia a métodos más completos como el de Secuenciación del Genoma Completo (WGS). En un estudio desarrollado a partir de aislamientos de leptospiras de 105 muestras de agua de diferentes fuentes: charcos, aguas residuales, arroyos, estanques, lagos y ríos en Estados Unidos (medio oriente). Utilizaron pruebas de cultivo y qPCR para el gen LipL32 para determinar especies patógenas de leptospiras. El 82 (78,1%) fueron positivos para el cultivo y cinco (4,8%) fueron positivos para el qPCR. Las secuenciaciones del genoma completo de los aislamientos cultivados identificaron dos muestras como especies patógenas, 10 como especies saprófitos y 3 muestras como nuevas especies saprofitas (Hamon *et al.*, 2024). Otra investigación realizado por Sergio J. *et al.*, (2022), secuenciaron el genoma completo mediante Secuenciación de Próxima Generación (Ion Torrent) de una cepa virulenta de *L. interrogans* aislado de agua de piscina al sur de Brasil y describieron sus características genéticas estructurales, evidenciando una serie de características moleculares como inversiones, translocaciones genómicas en ambos cromosomas, por lo que, podrían facilitar la identificación de nuevos objetivos para el desarrollo de kits de diagnóstico y vacunas.

Un estudio realizado en Perú, por éste grupo de investigación, en la que se empleó de la metodología del Secuenciamiento del Multilocus (MLST) para la determinación de nuevas

Variantes Genéticas de *Leptospira* patógenas procedentes de muestras de sangre de humanos y riñones de roedores y solo una muestra de agua de la Amazonia Peruana de Iquitos (Delgado et al., 2022) antecede al presente trabajo de investigación, con mayores aislamientos de leptospiras en muestras de agua.

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo General***

Caracterización de aislamientos de *Leptospira spp* procedentes de muestras de agua de zonas endémicas del Perú, mediante Secuenciación de Multilocus Loci (MLST) del 2019 y 2022.

#### ***1.3.2. Objetivos Específicos***

- Realizar el cultivo microbiológico y el PCR en tiempo real de muestras de agua para aislar e identificar *Leptospira spp*.
- Identificar especies y genotipos de *Leptospira spp* mediante el análisis de los perfiles alélicos MLST.
- Establecer la concatenación de alelos MLST para el análisis filogenético de los aislamientos analizados.

### **1.4. Justificación e importancia**

El empleo reciente de la metodología del MSLT y de otras metodologías serológicas como es el MAT utilizando antisueros referenciales complementan mejor la tipificación de la leptospirosis que se realiza en el Instituto Nacional de Salud, específicamente, el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas. Para la tipificación serológica en el laboratorio se utiliza el MAT directo, que identifica la leptospiras aislada con antisueros referenciales, donde resulta algunas veces complicado porque se producen reacciones cruzadas

frecuentes entre los serogrupos/serovares dentro de una especie específica de *Leptospira* y requiere de personal altamente capacitado, etc. Además, de otras pruebas moleculares como el PEFG que permite la caracterización molecular de la bacteria sólo hasta el nivel de serovar (Rivera et al., 2012). Los métodos como la secuenciación del gen ARNr 16S se limita a la definición solo a nivel de especies y no más allá de especies (Díaz, 2019; Ganoza et al., 2010). En el presente trabajo se empleó la técnica del MLST en aislados de leptospiras de muestras de aguas para su caracterización molecular en especies y en genotipos. Es técnica nos permitió conocer la circulación de especies y genotipos de leptospiras patógenas en muestras de aguas con importancia en la transmisión de la enfermedad hacia los huéspedes susceptibles como es el hombre.

### **1.5. Impactos esperados del trabajo académico**

El estudio de las fuentes ambientales como es el agua contaminadas con leptospiras constituyen focos de infección es muy importante en la salud pública, dado que el hombre como huésped susceptible se encuentra en contacto frecuente con el agua como medio de subsistencia, de manera similar las personas en zonas rurales de pobreza extrema que ante la falta de instalaciones de agua domiciliarias o agua potables, utilizan las fuentes naturales de dudosa procedencia en las zonas rurales, para su uso diario, para bañarse, para el lavado de ropa o para la preparación de alimentos; así mismo, las altas temperaturas ambientales también condicionan que los pobladores utilicen diversas fuentes de agua como las cochas, manantiales, quebradas, ríos, etc., para su higiene personal o actividades recreativas acuáticas, donde fácilmente pueden infectarse con estas especies bacterianas patógenas presentes en el agua y desarrollar la enfermedad de la leptospirosis.

La metodología MLST, aplicada a cepas y a muestras biológicas y ambientales como es el agua, provee resultados importantes para direccionar actividades de vigilancia



epidemiológica en diferentes medios de transmisión, debido a que la leptospiras presenta diversos reservorios animales, entre ellos, roedores infectados con leptospiras, que contaminan el medio ambiente con la bacteria a través de la orina. Además, de aspectos socioeconómicos y sanitarios deficientes, sumados a ello, factores climáticos como las fuertes lluvias e inundaciones condicionan la aparición de la leptospirosis. Además, conociendo la presencia de animales reservorios por la identificación de leptospiras por el MLST se podría establecer actividades de prevención y control de reservorios y el medio ambiente por las autoridades sanitarias.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1. Obtención de muestras de agua y cultivo de *Leptospira*

La obtención de los aislamientos a partir de muestras de agua fue a través de las actividades de Vigilancia de Leptospirosis en zonas endémicas del Perú realizada por el Instituto Nacional de Salud (INS), específicamente, el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas (LRNMEZOB) previa coordinación con los Laboratorios Referenciales Regionales en diversos departamentos del Perú.

El muestreo de agua fue considerando los casos positivos de leptospirosis en humanos (resultados previos de laboratorio de Elisa IgM emitidos en el Sistema informático del Netlab del INS). Las muestras de aguas fueron recolectadas en frascos estériles de boca ancha conjuntamente con una ficha epidemiológica para muestras ambientales (agua), teniendo en cuenta todas las medidas de bioseguridad, luego fueron trasladados al LRNMEZOB.

Las muestras de agua ya en el laboratorio, fue procesado a través de un reposo y filtración, de una hora aproximadamente para decantar el material sólido, posteriormente, con ayuda de una jeringa hipodérmica y filtros de 0.40  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  se filtraron el agua hasta obtener una muestra “más limpia”. A partir de la muestra filtrada se realizó el cultivo por triplicado en 9 ml de medio líquido denominado Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) que contiene albúmina sérica bovina con suero de conejo al 4%, antibióticos, entre otros componentes importantes.

Los cultivos fueron incubados de 28-30°C de 2 a 8 semanas con movimientos y pasajes semanales. El crecimiento bacteriano se da cuando son observados espiroquetas con el microscopio de campo oscuro a un aumento de 10X y 40X. Los cultivos contaminados fueron

descontaminados utilizando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  y a través de varios pasajes sucesivos del medio EMJH con antibiótico 5 flouracil, hasta obtener cultivos puros. La densidad microbiana fue evaluada por espectrofotometría con una densidad de 0.2 y mediante el conteo bacteriano en una cámara de *Petroff Housser* hasta contabilizar y obtener un cálculo de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> leptospiras/ml como concentración. Los cultivos bacterianos puros fueron utilizados para los análisis moleculares correspondientes. Toda la información epidemiológica se encuentra registrado en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Aislamientos de Leptospira spp procedentes de muestras de aguas superficiales de diferentes regiones del país del 2019 y 2022.*

| Nº | Código de laboratorio | Departamento | Provincia | Tipo de muestra   | Fuente de captación             | Fecha de recolección |
|----|-----------------------|--------------|-----------|-------------------|---------------------------------|----------------------|
| 1  | 239                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Captación 1                     | 14/03/2022           |
| 2  | 240                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Planta de tratamiento 1         | 14/03/2022           |
| 3  | 241                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Planta de tratamiento 2         | 14/03/2022           |
| 4  | 242                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Planta de tratamiento 2         | 14/03/2022           |
| 5  | 243                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Reservorio - Ayabaquita         | 14/03/2022           |
| 6  | 244                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Grifo                           | 14/03/2022           |
| 7  | 245                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Grifo                           | 14/03/2022           |
| 8  | 246                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Reservorio 1                    | 14/03/2022           |
| 9  | 247                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Reservorio 2                    | 14/03/2022           |
| 10 | 248                   | Cajamarca    | Jaén      | Quebrada          | Institución Educativa           | 14/03/2022           |
| 11 | 1A                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 12 | 2B                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 13 | 3A                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 14 | 4A                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 15 | 5A                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 16 | 7B                    | Piura        | Morropón  | Cultivos de arroz | Cultivos de arroz               | 10/04/2022           |
| 17 | 9A                    | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 18 | 10A                   | Piura        | Morropón  | Riachuelo         | Grifo                           | 10/04/2022           |
| 19 | 362                   | Loreto       | Maynas    | Desagüe la chacra | Agua de desagüe Fundo la Chacra | 8/08/2022            |

|    |     |               |                  |                   |                                   |            |
|----|-----|---------------|------------------|-------------------|-----------------------------------|------------|
| 20 | 363 | Loreto        | Maynas           | Rio Nanay         | Agua de desagüe embarcadero Nanay | 29/07/2022 |
| 21 | 364 | Loreto        | Maynas           | Desague la chacra | Agua de desagüe Fundo la Chacra   | 18/07/2022 |
| 22 | 365 | La Libertad   | Trujillo         | Quebrada          | Agua de quebrada                  | 1/11/2022  |
| 23 | 394 | Ucayali       | Coronel Portillo | Acequia           | Acequia                           | 5/12/2019  |
| 24 | 395 | Loreto        | Alto Amazonas    | Lago              | Lago                              | 17/11/2019 |
| 25 | 396 | Loreto        | Alto Amazonas    | Riachuelo         | Grifo                             | 20/11/2019 |
| 26 | 397 | Loreto        | Alto Amazonas    | Rio               | Charco de rio                     | 29/11/2019 |
| 27 | 398 | Loreto        | Alto Amazonas    | Rio               | Charco de rio                     | 25/11/2019 |
| 28 | 399 | Madre de Dios | Tambopata        | Rio Tambopata     | Charco de rio                     | 1/12/2019  |
| 29 | 400 | Madre de Dios | Tambopata        | Rio Tambopata     | Charco de rio                     | 3/12/2019  |
| 30 | 401 | Madre de Dios | Tambopata        | Pozo              | Agua de pozo                      | 22/11/2019 |
| 31 | 402 | Madre de Dios | Tambopata        | Pozo              | Agua de pozo                      | 22/11/2019 |
| 32 | 403 | San Martin    | Morales          | Quebrada          | Charco                            | 22/11/2019 |

## 2.2. Extracción de ADN y amplificación mediante el PCR en tiempo real (qPCR)

A partir de una densidad microbiana aproximada de  $10^8$  leptospiras/ml se tomaron 5 ml de cultivo y se centrifugaron a 10 000g por 15 minutos para obtener un pellet que a partir de ahí se realizaron la extracción del ADN con un kit comercial denominado PureLink™ Genomic DNA de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de la concentración del ADN extraído fue por fluorometría en Qubit 2.0 (Invitrogen, EEUU) empleando el Kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit *Invitrogen*. La pureza del ADN extraído fue evaluada mediante espectrofotometría en una ratio 260/280 en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), considerando una muestra de ADN pura aquellas que presenten una relación de 1.8 a 2.

El qPCR utilizado permite la detección de especies patógenas e intermedias de leptospiras, para ello, se utilizó el kit de amplificación Kapa Probe Fast qPCR Master Mix

(2X). Los primers y sonda fueron dirigidos al gen *rrs* del ARNr 16S, propuestos por Smythe (2002) y optimizado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas denominada metodología del PCR en tiempo real para el diagnóstico de leptospirosis (MET-CNSP-61) amplificando un fragmento de 87 pb.

### 2.3. PCR y Secuenciación mediante MLST

La detección de especies patógenas del género *Leptospira*, se llevó a cabo mediante la amplificación de 7 genes específicos *housekeeping*: *glmU-pntA-sucA-tipA-pfkB-mreA-caiB* del esquema #1 descrito por Boonsilp et al. (2013), optimizado y modificado previamente por este autor (Delgado et al., 2022). Los controles incluidos en la corrida fueron: un control positivo ADN genómico de cepa de referencia, un control negativo agua de PCR, para asegurar que los reactivos estén libres de contaminación con algún material genético. El PCR de punto final fue realizado en un termociclador de Applied Biosystems.

Se utilizó la electroforesis para visualizar a los productos del PCR en geles de agarosa al 1.5%, para ello, se usaron buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para colorear y un fotodocumentador de imágenes para observar los geles. El tamaño del producto fue estimado mediante comparación con un estándar de peso molecular de 100 pb a 1000pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen).

Para la secuenciación se usaron los mismo primers del PCR de punto final, kits para purificar producto de PCR, kit de secuenciación Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), placa óptica y ADN normalizado a 5 ng/ml y un segundo kit para purificación del producto de reacción de secuenciación por columnas Centriprep, seguido del secado de la muestra al vacío, la re suspensión con formamida y la denaturación del ADN incrementando la temperatura y puesta inmediata en hielo y el cargado en el equipo y finalmente la

secuenciación mediante la metodología de Sanger en ambas direcciones en el equipo aanalizador genético 3500XL (Applied Biosystems).

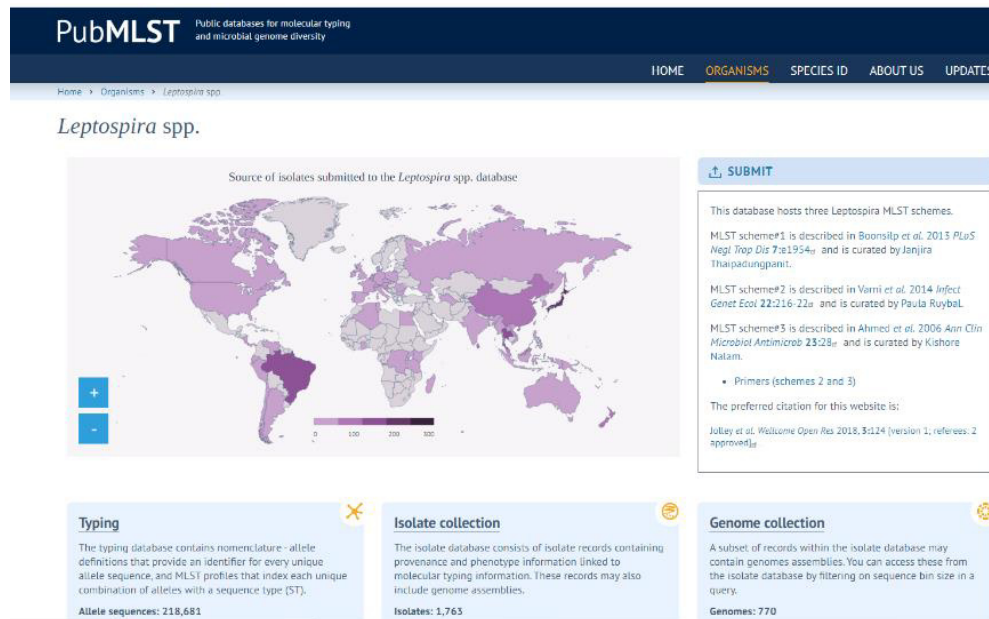
#### 2.4. Análisis de secuencias

Para el análisis de los cromatogramas que arroja el analizador genético 3500XL en formato Abi, fue mediante el programa bioinformático SeqScape v 2.7 de Applied Biosystems. La calidad de las secuencias fue eliminando los sitios de unión a primers y los segmentos de baja calidad. Se procedió al ensamblaje de novo de las lecturas mediante el solapamiento de las mismas. Se obtuvo una secuencia consenso o contig en formato fasta para cada una de los siete genes. El análisis de secuencias de cada uno de los 7 genes fue ingresadas a la página MLST: <http://pubmlst.org/leptospira/> para la asignación de un código alélico y el conjunto de los siete alelos (un perfil alélico) en el orden *glmU-pntA-sucA-tipA-pfkB-mreA-caiB* nos arroja otro valor que es el *sequence type* (ST) o genotipo dentro de cada especie (Figura 1).

Para la concatenación de las secuencias de los 7 genes de las muestras y las referenciales descargadas de la página web MLST se utilizó el programa Sequence Matrix v8 haciendo un total de 3111pb (Vaida et al., 2011). Por otro lado, las secuencias concatenadas de las muestras fueron alineadas y comparadas con secuencias disponibles de la base de datos del Genbank, a través de la herramienta Blast, permitiendo observar características como la cobertura e identidad (porcentaje de homología y grado de identidad entre las secuencias problema y las que existen reportadas en las bases de datos) y el e-value como la probabilidad de que el resultado obtenido sea el más certero). El análisis Blast determinó el porcentaje de identidad con especies cercanas del genero *Leptospira*.

## Figura 1

Base de datos MLST (<http://pubmlst.org/leptospira/>)



## 2.5. Análisis filogenético

Para el alineamiento de secuencias de las muestras y las referenciales se utilizó el programa bioinformático Mega XI (Kumar et al., 2028) mediante el método Neighbor-Joining con un valor de bootstrap inicial de 1000 y utilizando el modelo de dos parámetros de kimura, los mismos que sirvieron para obtener la clasificación y relación filogenético de especies y de los ST determinados en el árbol filogenético.

### III. RESULTADOS

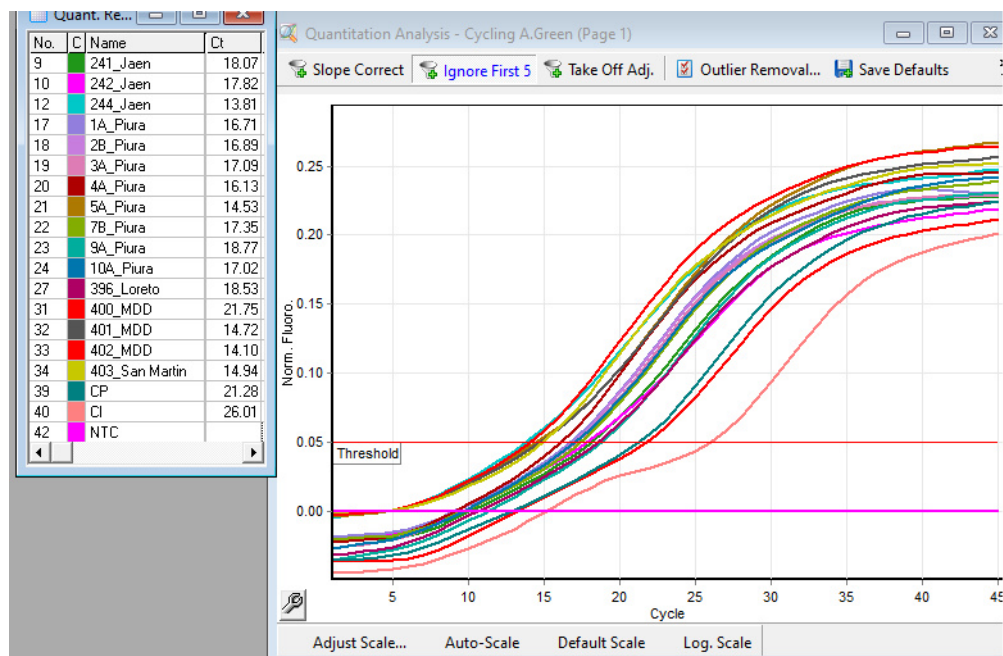
El presente estudio muestra resultados de laboratorio (cultivo, qPCR y el MLST) de aislamientos de *Leptospira* spp de diferentes fuentes de agua de diferentes áreas geográficas del país.

#### 3.1. PCR en tiempo real

De un total de 32 (100%) aislamientos procesados por el qPCR, el 50% (16/32) resultaron positivos y el otro 50% (16/32) fueron negativos al qPCR. La positividad esta direccionado al grupo de leptospiras de dos grandes grupos filogenéticos: patógenos e intermedios (Figura 2).

**Figura 2**

*Resultados del qPCR para aislamientos de leptospiras de muestras de agua del 2019 y 2022.*



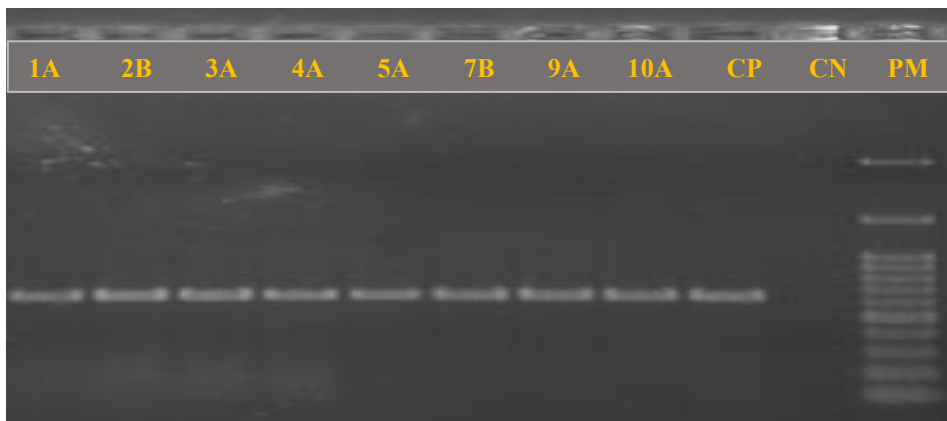


### 3.2. PCR- MLST

De un total de 32(100%) aislamientos de leptospiras de muestras de agua, el 25% (8) fueron positivos al PCR-MLST, tal como figuran en las siguientes figuras del 3 al 9.

#### Figura 3

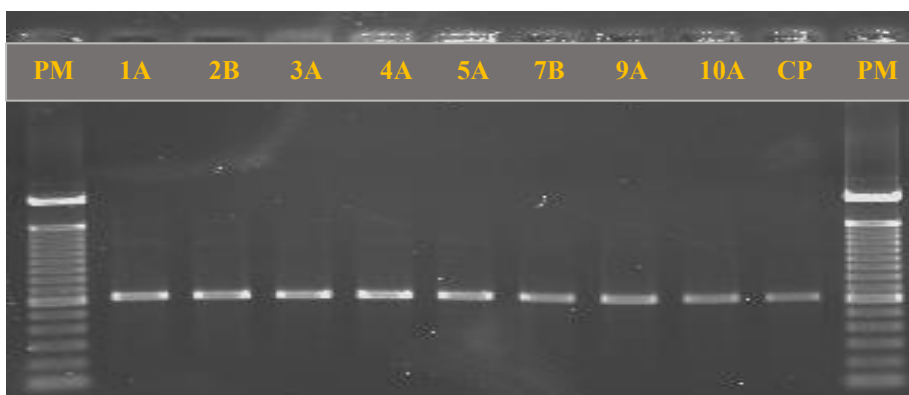
*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen glmU de 650pb.*



*Leyenda:* 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo, CN: control negativo, PM: marcador de peso molecular.

#### Figura 4

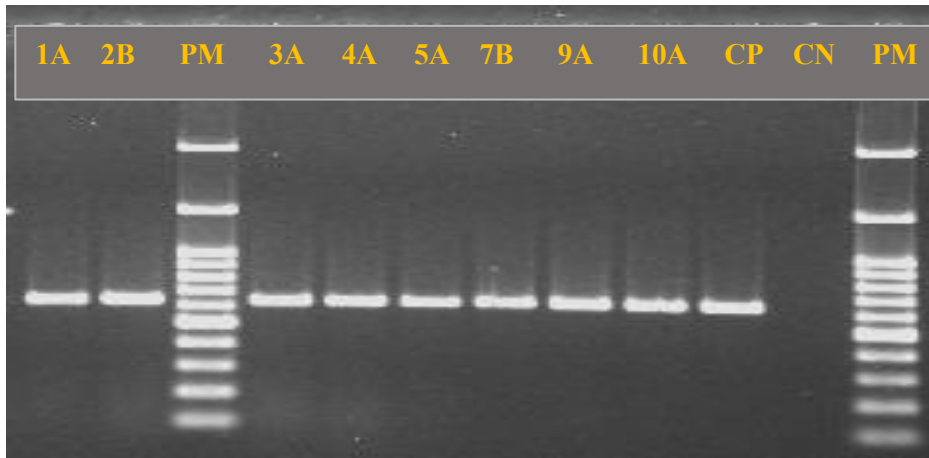
*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen pntA de 621pb.*



*Leyenda:* PM: marcador de peso molecular. 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo.

### Figura 5

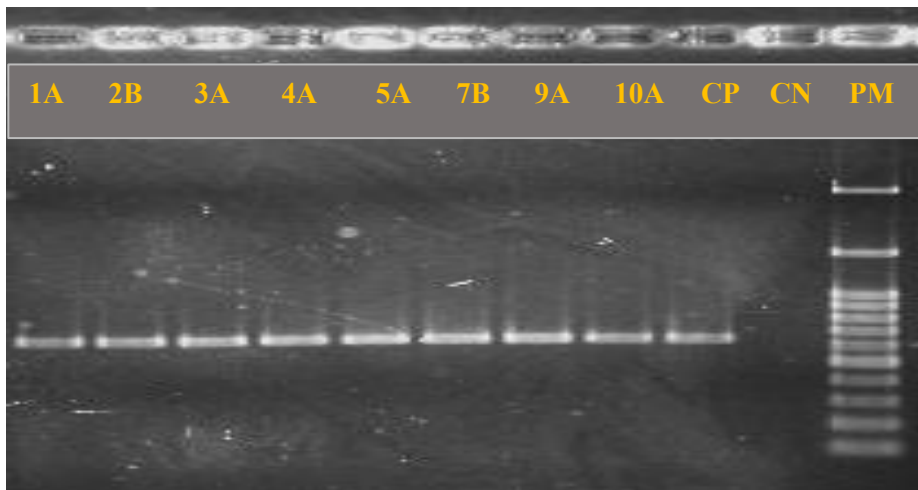
*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen *sucA* de 640pb.*



*Leyenda:* PM: marcador de peso molecular. 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo, CN: control negativo.

### Figura 6

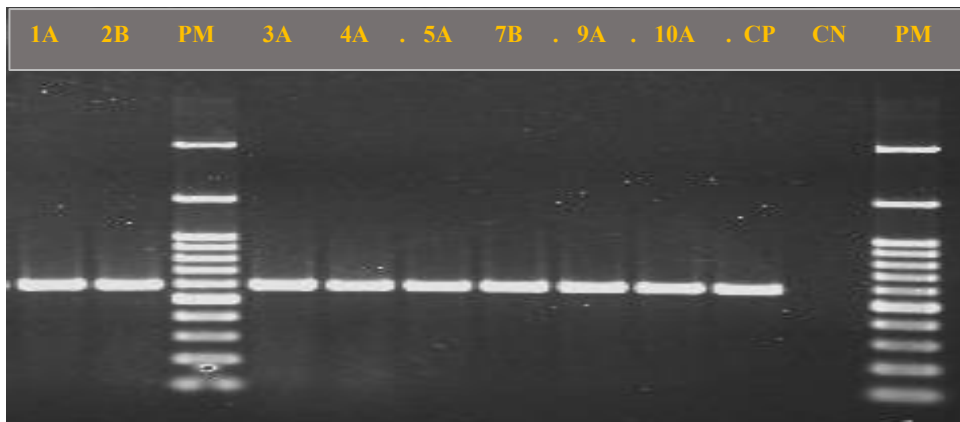
*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen *tpiA* de 639pb.*



*Leyenda:* PM: marcador de peso molecular. 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo, CN: control negativo.

### Figura 7

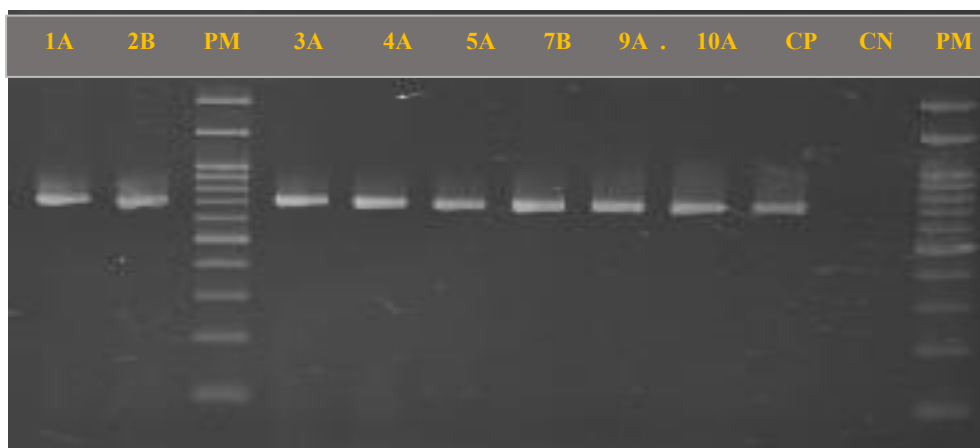
*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen pfkB de 588pb.*



*Leyenda:* PM: marcador de peso molecular. 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo, CN: control negativo.

### Figura 8

*Resultados de Electroforesis del PCR-MLST para el gen mreA de 719pb.*



*Leyenda:* PM: marcador de peso molecular. 1A, 2B, 3A, 4A, 5A, 7B, 9A y 10A son muestras de Piura, CP: control positivo, CN: control negativo.



|    |      |          |          |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
|----|------|----------|----------|-----------------------|---|---|---|-----|----|---|---|-----|
| 8  | 246  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 9  | 247  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 10 | 248  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 11 | 1A*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 12 | 2B*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 13 | 3A*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 14 | 4A*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 15 | 5A*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 16 | 7B*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 17 | 9A*  | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 1 | 5   | 12 | 2 | 9 | 13  |
| 18 | 10A* | positivo | positivo | <i>L. interrogans</i> | 1 | 1 | 2 | 5   | 12 | 2 | 9 | *13 |
| 19 | 362  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 20 | 363  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 21 | 364  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 22 | 365  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 23 | 394  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 24 | 395  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 25 | 396  | positivo | positivo |                       |   |   |   | 69* |    |   |   |     |
| 26 | 397  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 27 | 398  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 28 | 399  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 29 | 400  | positivo | negativo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 30 | 401  | positivo | positivo |                       |   |   |   |     |    |   |   |     |
| 31 | 402  | positivo | positivo |                       |   |   |   | 57* |    |   |   |     |
| 32 | 403  | positivo | positivo |                       |   |   |   | 57* |    |   |   |     |

\*muestras enviadas al curador de la base de datos MLST para la identificación del ID.

Además, otras muestras (241, 242 y 244 de Jaén, 396 de Alto Amazonas-Loreto, 402 de Madre de Dios y 403 de San Martín) resultaron positivos al PCR-MLST para el gen *tpiA*, sin embargo, en el secuenciamiento arrojaron secuencias de ADN incompletos, lo que imposibilita el análisis genético (tabla 2).

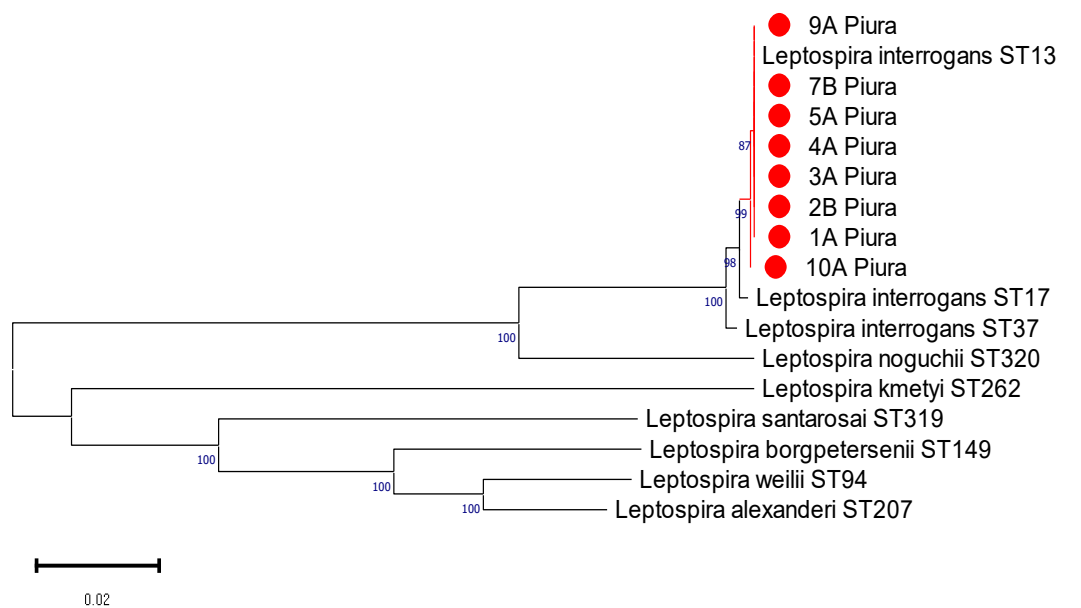
### 3.4. Identificación de especies de *Leptospira* patógeno por filogenia

De las 8 (25%) aislamientos secuenciados para los 7 genes y analizados por la página MLST, determinaron como especie predominante a *L. interrogans* y el ST13 para siete muestras, seguido de una muestra (un genotipo) considerado como “ST nuevo” debido a la combinación del alelo *sucA* 2 presente en el ST17 (tabla 2), el cual fue enviado al curador de la página MLST para la asignación del correcto ST hallado en muestras de agua de la Región Piura (respuesta en espera). Además, el análisis *Blast* determinó que las 8 muestras de ADN concatenadas mostraron un 100 % de identidad con la especie de *L. interrogans*.

Los análisis filogenéticos de los aislados de Piura se relacionan estrechamente con el genotipo ST13 de la especie *L. interrogans* de la base de datos MLST (Figura 10).

**Figura 10**

*Análisis filogenético de Leptospira patógeno procedentes de muestras de agua mediante el método de Neighbour-Joining en el Programa Mega XI.*



En el presente trabajo mediante la prueba microbiológica del cultivo se aislaron *Leptospira* spp de todas las muestras de agua en un 100%, de los cuales, un 50% fueron positivos al qPCR y de ellos el 25% lograron ser secuenciadas como leptospiras patógenas, porque el MLST está direccionado a ese grupo específico de los patógenos.

Son cinco regiones donde se encontraron leptospiras según el PCR en tiempo real: Jaén (3), Piura (8), Alto Amazonas-Loreto (1), Madre de Dios (3) y San Martín (1). La mayoría de ellos son aguas que se encuentran directamente relacionados con el uso cotidiano ya que se tratan de agua de consumo humano, ya sea agua de planta de tratamiento, de grifo, de poza, o del contacto en el cultivo de arroz, como figura en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Resultados de la prueba del PCR en tiempo real para Leptospira patógenos e intermedios determinados procedente de muestras de agua de los años 2019 y 2022.*

| Nº | Código de laboratorio | Departamento         | Tipo de muestra   | Fuente de captación     | Fecha de recolección | qPCR     |
|----|-----------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------|
| 3  | 241                   | Cajamarca            | Quebrada          | Planta de tratamiento 2 | 14/03/2022           | Positivo |
| 4  | 242                   | Cajamarca            | Quebrada          | Planta de tratamiento 2 | 14/03/2022           | Positivo |
| 6  | 244                   | Cajamarca            | Quebrada          | Grifo                   | 14/03/2022           | Positivo |
| 11 | 1A                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 12 | 2B                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 13 | 3A                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 14 | 4A                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 15 | 5A                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 16 | 7B                    | Piura                | Cultivos de arroz | Cultivos de arroz       | 10/04/2022           | Positivo |
| 17 | 9A                    | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 18 | 10A                   | Piura                | Riachuelo         | Grifo                   | 10/04/2022           | Positivo |
| 21 | 396                   | Loreto-Alto Amazonas | Riachuelo         | Grifo                   | 20/11/2019           | Positivo |
| 25 | 400                   | Madre de Dios        | Río Tambopata     | Charco de río           | 3/12/2019            | Positivo |
| 26 | 401                   | Madre de Dios        | Pozo              | Agua de pozo            | 22/11/2019           | Positivo |
| 27 | 402                   | Madre de Dios        | Pozo              | Agua de pozo            | 22/11/2019           | Positivo |

|    |     |            |          |                  |            |          |
|----|-----|------------|----------|------------------|------------|----------|
| 28 | 403 | San Martín | Quebrada | Agua de quebrada | 22/11/2019 | Positivo |
|----|-----|------------|----------|------------------|------------|----------|

En el análisis de secuencia de ADN, 7(87.5%) de muestras corresponden a la *Leptospira interrogans* genotipo ST13 y una muestra (10A) como genotipo nuevo “ST13” por la similitud en 6 de los 7 alelos con el ST13 y el 2 alelo para el gen *sucA* del ST17, considerándose como “ST nuevo”, específicamente, difiere de una mutación puntual en la posición (A411G) para el gen *sucA*, es decir, lleva una guanina (G), parecida al alelo 2 del gen *sucA* del ST17. Similar resultado se ha podido visualizar en una muestra de agua, en otro estudio anterior realizado por este grupo de estudio, una mutación puntual para el gen *sucA* en la posición A373G generó una variante alélica nueva, por lo tanto, un nuevo genotipo (Delgado et al., 2022).

Es de destacar que se encontraron aguas infectadas con leptospiras positivos al qPCR direccionados al grupo de los patógenos e intermedios, en tanto que el MLST permitió identificar leptospiras de un grupo más específicos, como son patógenos estrictos en el agua en la Región de Piura (Distrito Yamango de la Provincia de Morropón). La fuente de agua es un riachuelo que abastece a lo largo de la comunidad rural y es para el uso y consumo humano, el mismo que ingresa para el cultivo de arroz, donde la población que utilizan dicha agua y los agricultores de la zona se encuentran en riesgo de contraer la infección de la *Leptospira* transmitida por el contacto con agua contaminada.



#### IV. CONCLUSIONES

- Se lograron aislar y detectar *Leptospira* spp de muestras de agua mediante pruebas de laboratorio de cultivo y qPCR respectivamente procedentes de la Vigilancia de Leptospirosis de zonas endémicas del país de los años 2019 y 2022.
- Se caracterizaron especies y genotipos de *Leptospira* patógena procedente de muestras de agua de la Vigilancia de Leptospirosis en el Perú mediante el análisis de los perfiles alélicos MLST.
- Se establecieron la relación filogenética de los aislamientos analizados.

## V. RECOMENDACIÓN

- Se recomienda ampliar el estudio incluyendo mayores áreas geográficas en muestras ambientales para la obtención de aislamientos de leptospiros de muestras de agua con un muestreo aleatorio de diferentes lugares para poder extrapolar la información obtenida.

## VI. REFERENCIAS

- Ahmed, N., Devi, S. M., de los Á Valverde, M., Vijayachari, P., Machangu, R. S., Ellis, W. A., y Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>.
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F., y Thorin, C. (2015). Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Current Microbiology*, 71(1), 136-142. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>.
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., y Goarant, C. (2020). A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*, 15(1), e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M., Holden, M., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A. R., Craig, S., Smythe, L. D., Hartskeerl, R., Day, N., Chantratita, N., Feil, E., Aanensen, D., Peacock, S. (2013). A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>.
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., y Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- Delgado, M. A., Cáceres, O. A., Calderón, J. E., Balda, L., Sotil, G., y Céspedes, M. J. (2022). New Genetic Variants of *Leptospira* spp Characterized by MLST from Peruvian Isolates. *Journal of Tropical Medicine*, 2022, e4184326. <https://doi.org/10.1155/2022/4184326>.

- Diaz, O. (2019). Asociación entre especies patógenas de *Leptospira* spp y sus reservorios domésticos no roedores, dentro de una localidad urbana de la Amazonia Peruana. Universidad Nacional Cayetano Heredia.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. y Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518-1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>.
- Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D. E., Bulach, D., Buschiazzo, A., Chang, Y.-F., Galloway, R. L., Haake, D. A., Haft, D. H., Hartskeerl, R., Ko, A. I., Levett, P. N., Matsunaga, J., Mechaly, A. E., Monk, J. M., Nascimento, A. L. T., Vinetz, J. M. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>.
- Ganoza, C. A., Matthias, M. A., Collins-Richards, D., Brouwer, K. C., Cunningham, C. B., Segura, E. R., Gilman, R. H., Gotuzzo, E., y Vinetz, J. M. (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Medicine*, 3(8), e308. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030308>.
- Ganoza, C. A., Matthias, M. A., Saito, M., Cespedes, M., Gotuzzo, E., y Vinetz, J. M. (2010). Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(2), e612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612>.
- Haake, D. A. y Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in Humans. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 65-97). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5).

- Hamond, C., LeCount, K., Anderson, T., Putz, E. J., Stuber, T., Hicks, J., Camp, P., van der Linden, H., Bayles, D. O., Schlater, L. K., y Nally, J. E. (2024). Isolation and characterization of saprophytic and pathogenic strains of *Leptospira* from water sources in the Midwestern United States. *Frontiers in Water*, 6. <https://doi.org/10.3389/frwa.2024.1278088>.
- Jorge, S., Kremer, F. S., Rodrigues de Oliveira, N., Navarro, G. de O. S. V., Guimarães, A. M., Sanchez, C. D., Woloski, R. D. dos S., Ridieri, K. F., Campos, V. F., Pinto, L. da S., y Dellagostin, O. A. (2018). Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: Genetic features of a highly virulent strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(2), 80-86. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170130>.
- Ko, A. I., Goarant, C., y Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(10), 736-747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., y Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140-3145.
- Matthias, M. A., Ricaldi, J. N., Céspedes, M., Diaz, M. M., Galloway, R. L., Saito, M., Steigerwalt, A. G., Patra, K. P., Ore, C. V., Gotuzzo, E., Gilman, R. H., Levett, P. N.,

- y Vinetz, J. M. (2008). Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a Rattus Species Reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4), e213. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000213>.
- Picardeau, M. (2015). Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (Vol. 387, pp. 43-63). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4).
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Rivera, P., Ticlla, M., Balda, L., Gonzalez, D., y Céspedes, M. (2012). Diversidad genética de aislamientos peruanos de *Leptospira* spp. Mediante electroforesis en gel de campo pulsado. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 29(4), 469-476. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1726-46342012000400008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342012000400008&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpaboon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A. T., Suputtamongkol, Y., White, N. J., Feil, E. J., Day, N. P. J., y Peacock, S. J. (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056>.
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., y Goarant, C. (2018). Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>.
- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., y Goarant, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils

uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, 4(1).  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>.

Vaidya, G., Lohman, D. J., y Meier, R. (2011). SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>

Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M. K. N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., y Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000727>.