

# Análisis de proteínas de *Leptospira* y su uso potencial en el desarrollo de métodos rápidos de detección de IgG e IgM para uso humano y veterinario.

Analysis of *Leptospira* proteins and their potential use in the development of rapid IgG- and IgM-detection methods for human and veterinary use

✉ Díaz I, C.<sup>1</sup>; Altamirano-Lagos, MJ.<sup>2</sup>; Vasquez, AE.<sup>3</sup>.

✉ <sup>1</sup>Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile. <sup>2</sup>Sección de Biotecnología, Departamento Agencia Nacional de Dispositivos Médicos, Innovación y Desarrollo, Instituto de Salud Pública de Chile. <sup>3</sup>Departamento de Investigación, Postgrado y Educación Continua (DIPEC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Alba, Santiago, Chile.

✉ Autor para correspondencia: Abel E.Vasquez email: [avasquez@ispch.cl](mailto:avasquez@ispch.cl)

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana de distribución mundial que afecta tanto a humanos como a animales domésticos y salvajes por contacto directo o indirecto con la orina de huéspedes infectados. Los roedores no desarrollan las enfermedades, pero sí son reservorios naturales, eliminando leptospira en la orina; esta es la principal forma de infectar a otras especies animales. Se considera una enfermedad emergente debido al aumento de la incidencia en perros domésticos en algunos países del mundo. La prueba serológica estándar de oro para la leptospirosis es la prueba de aglutinación modificada (MAT). Tiene una alta especificidad y se puede identificar el serogrupo infectante. Sin embargo, esta técnica no está ampliamente disponible en todos los laboratorios, al menos en Chile. Por lo tanto, se necesitan pruebas de detección rápida. Aquí analizamos diferentes proteínas de *Leptospira interrogans* con uso potencial en el desarrollo de una prueba rápida de inmunocromatografía para la detección de IgM e IgG en sangre o suero para uso humano y veterinario.



### Palabras Claves:

*Leptospira*; LipL21; LipL32; LipL41; Pruebas rápidas.

### Keywords:

*Leptospira*; LipL21; LipL32; LipL41; rapid test.

### ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease with worldwide distribution that affects humans as well as domestic and wild animals through direct or indirect contact with the urine of infected hosts. Rodents do not develop the diseases, but they do shed leptospira in their urine—this is the main way of infecting other animal species. It is considered an emerging disease due to the increased incidence of domestic dogs in some countries around the world. The gold standard serological test for leptospirosis is the modified agglutination test (MAT). It has high specificity and can identify the infecting serogroup. However, this technique is not widely available in all laboratories, at least in Chile. Thus, rapid detection tests are needed. Here we analyze different leptospira interrogans proteins with potential use in the development of a rapid immunochromatography test for the detection of IgM and IgG in blood or serum for both human and veterinary use

## INTRODUCCIÓN

### Leptospirosis y leptospira

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, causada por espiroquetas infecciosas gram negativas del género *Leptospira*, familia Leptospiraceae. La *Leptospira* es una bacteria aerobia obligada que crece a una temperatura óptima entre 28-30°C (1). El género *Leptospira* se clasifica en dos especies: *Leptospira interrogans* (cepas patógenas) y *Leptospira biflexa* (cepas saprófitas). Hasta la fecha se han descrito más

de 24 serogrupos y 250 serovares de leptospiras (2). Las cepas patógenas no pueden reproducirse fuera de sus hospederos y aproximadamente 200 animales, incluidos el ganado y los perros, han sido confirmados como huéspedes de especies patógenas de *Leptospira* (3).

Esta bacteria infecta a casi todos los mamíferos y roedores que actúan como sus principales reservorios y la eliminan al ambiente por medio de la orina. En las zonas urbanas, donde se han realizado la mayoría de los estudios, las ratas y los perros son portadores



Copyright © 2022. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la *Creative Commons Attribution License (CC BY)*. El uso, distribución o reproducción en otros foros está permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

**Conflicto de interés.** Los autores declaran no tener conflicto de interés

**Financiamiento.** Los autores declaran ser funcionarios del Instituto de Salud Pública, no habiendo obtenido remuneración ni compensación económica alguna por la elaboración de este artículo.

comunes y a menudo se han identificado como fuentes potenciales de infección humana (4-6). La leptospirosis no solo es un problema de salud pública en los países en desarrollo, sino que se ha convertido en un problema de salud urbana en los países desarrollados e industrializados, afectando entornos insalubres en las ciudades durante períodos de lluvias estacionales e inundaciones. Además, existen riesgos de contagio asociados con algunas actividades como el trabajo agrícola, la medicina veterinaria, el ejército, la investigación de trabajo de campo y vivir cerca de plantaciones, siendo denominada una enfermedad ocupacional (7).

La enfermedad generalmente se presenta como una enfermedad bifásica, con una enfermedad aguda inicial que dura aproximadamente 1 semana caracterizada por fiebre, mialgia y dolor de cabeza que puede confundirse con otras entidades como la gripe, dengue y hantavirus (7). En muchos casos, los agentes patógenos se distribuyen desde el torrente sanguíneo a los pulmones, el hígado, los riñones y el líquido cefalorraquídeo para causar hemorragia difusa pulmonar letal, insuficiencia renal grave inducida por ictericia y meningoencefalitis en el caso de los humanos. Alrededor del 10% de los pacientes diagnosticados desarrollarán ictericia, lesión renal aguda (LRA) o insuficiencia renal, también conocida como enfermedad de Weil, esto ocurre en casos graves, que se manifiesta como LRA o insuficiencia renal con hepatomegalia y daño a la función hepática (8-10).

En los animales de producción, la leptospirosis está asociada a abortos, nacimiento de animales debilitados y mortalidad en la mayoría de los casos. En los bovinos, específicamente, las pérdidas económicas causadas por la leptospirosis están directa o indirectamente ligadas a las fallas reproductivas como infertilidad y aborto, así como a la caída de la producción de los productos y subproductos que producen estos animales. Uno de los hallazgos de importancia que se reporta en la inspección post mortem del ganado bovino es la presencia de riñones con nefritis intersticial focal (NI), caracterizada macroscópicamente por focos dispersos de color blanco/ gris (11-13).

En Chile la Leptospirosis es de notificación obligatoria, y como tal, debe notificarse y tratarse con cargo a la Ley 16.744 (accidentes de trabajo y enfermedades profesionales) (14). En los últimos 10 años (período 2012 a 2021) se notificaron 99 casos de leptospirosis, con tasas de incidencia anuales que variaron entre 0,02 y 0,10 casos por cien mil hab. (esta última observada el año 2018). En el año 2021 se observó una incidencia de 0,05 por cien mil hab., con un total de 9 casos, un 25% por debajo respecto de la mediana del quinquenio anterior (n=13 casos). Según región de notificación, la

región del Ñuble tuvo la tasa de incidencia más alta (0,39 por cien mil hab.), seguida por las regiones de Valparaíso y Biobío, con una tasa de incidencia de 0,10 y 0,12, respectivamente (15).

## Diagnóstico

La detección y diagnóstico de *Leptospira* es relevante en la clínica, ya que no siempre es oportuno y frecuentemente se confunde con otras enfermedades febriles. Además, los síntomas son similares a otras infecciones virales y bacterianas (16).

La metodología microbiológica de referencia es la prueba de aglutinación microscópica de suero (Microscopic Agglutination Test, MAT), la cual tiene una alta especificidad y puede identificar el serogrupo infectante. Es compleja de realizar y tiene muchas limitaciones en las aplicaciones clínicas. MAT también puede retrasar la identificación y el tratamiento de la enfermedad porque las IgG e IgM solo aparecen del día 5 al día 7 después de la infección por *Leptospira* (17-18). El diagnóstico de la leptospirosis debe ser oportuno y el tratamiento temprano con penicilina es eficaz y puede salvar drásticamente a los pacientes de la insuficiencia multiorgánica (19).

Para determinar la existencia de leptospirosis en términos generales las pruebas se dividen en dos grandes grupos (20). El primero es aquella que evidencia directa infección (demostración de leptospirosis o su ADN, o cultivo) y pruebas que proporcionan evidencia indirecta de infección (demostración de anticuerpos contra la leptospirosis).

La detección de la enfermedad por medio de PCR o QPCR de manera cuantitativa tiene mayor probabilidad de ser positivo los primeros 8 días antes de la formación de anticuerpos y la eliminación de organismos en el torrente sanguíneo (21). El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y pruebas rápidas de flujo lateral inmunocromatográficas detectan anticuerpos que reaccionan con un antígeno específico del género ampliamente reactivo y pueden detectar anticuerpos del tipo IgM o IgG dependiendo del tiempo transcurrido desde la infección. Pero estas técnicas no permiten identificar el serovar o serogrupo causante de la enfermedad (22).

## Proteínas con potencial uso para la detección de *Leptospira*

*Leptospira* es una bacteria con una doble membrana, la membrana externa de contiene componentes antigénicos que incluyen lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos (PGN) (23). El lipopolisacárido leptoespiral es un inmunógeno protector, pero la extensa diversidad serológica de

Leptospira ha inspirado una búsqueda de proteínas conservadas de la membrana externa (OMP) con potencial para el desarrollo de vacunas y blancos para la detección (24-25).

### LipL21

Se identificó la proteína LipL21 de 21 Kda que es el segundo constituyente más abundante del proteoma de la membrana externa de *Leptospira interrogans*, siendo bien conservado entre los serovares patógenos de *Leptospira* y no pudo detectarse en los serovares saprófitos (26-27).

Una de las maneras para purificar esta proteína es mediante el fraccionamiento de membranas utilizando Triton X-114 (28). Además, se ha obtenido mediante técnicas de ADN recombinante, donde se ha expresado en *E. coli* como una proteína recombinante soluble (29).

LipL21, al ser una proteína de membrana externa, es ideal para la generación de anticuerpos, ya que los anticuerpos monoclonales contra las proteínas de la membrana externa se ha demostrado que tienen potencial para su uso en pruebas de diagnóstico (30).

### LipL32

La lipoproteína LipL32 (32 Kda) es uno de los componentes más abundantes de la membrana externa de la *Leptospira* y se encuentra presente sólo en las especies patógenas y ausente en las saprófitas. Se estima que LipL32 ocupa alrededor de 20% aproximado de la superficie interna de membrana externa (OM), siendo un factor importante en la estimulación de la respuesta inflamatoria en el huésped durante la fase de infección (31). Tiene un alto nivel de conservación de secuencias, con más del 94 % de identidad de secuencias de aminoácidos en las principales especies patógenas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* (32).

La proteína es altamente inmunogénica; La IgG específica de LipL32 se puede detectar en sueros de leptospirosis aguda y convaleciente. Esta proteína se utiliza actualmente como biomarcador en la detección de antígenos y actúa como antígeno en ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) de IgM e IgG para detectar anticuerpos específicos de LipL32 para el serodiagnóstico de la leptospirosis (33).

### LipL41

La proteína LipL41 es la tercera más abundante en la membrana externa de *Leptospira* y al igual que las dos anteriores solo se encuentra en las leptospirosis patógenas, utilizando residuos de Cys para modificar

las moléculas lipídicas para formar lipoproteínas que se anclan en la membrana externa de *Leptospira*, siendo un factor de virulencia importante (34). LipL41 tiene un peso de 41 kDa y no se ve afectada por la temperatura, la osmolaridad y otros factores ambientales, está estabilidad permite utilizarla para estudios en los efectos de las condiciones de crecimiento sobre la expresión de otros genes y proteínas (35).

## CONCLUSIÓN

Existen tres proteínas conservadas en la membrana externa en *Leptospira* con un potencial para desarrollar una prueba rápida inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM en suero de mamíferos que estén cursando una infección, estas son LipL21, LipL32 y LipL41.

Se recomienda una vigilancia y estudios epidemiológicos tanto locales como nacionales que permitan conocer con más detalle el comportamiento de esta patología, facilitándoles a las entidades pertinentes diseñar estrategias de salud pública en intervención y prevención. Es importante mencionar que existen varias pruebas rápidas disponibles comercialmente que detectan anticuerpos, pero deben ser evaluados en su sensibilidad y la especificidad, la cual puede ser variar en diferentes regiones geográficas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johns Hopkins University. Coronavirus Resource Center. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. 2021 [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/>
2. Organización Mundial de la Salud. Declaración sobre la segunda reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) acerca del brote del nuevo coronavirus (2019-nCoV). 2020 [citado 31 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/es/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))
3. Organización Mundial de la Salud. La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia - OPS/OMS. Organización Panamericana de la Salud. 2020 [citado 31 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia>
4. Ministerio de Salud de Chile. Casos confirmados en Chile COVID-19. Ministerio de Salud – Gobierno de Chile. 2021 [citado 9 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.minsal.cl/nuevo-coronavirus-2019-ncov/casos-confirmados-en-chile-covid-19/>
5. Universidad de Chile. Las estrategias de los países para combatir la expansión del coronavirus. 2020 [citado 31 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://uchile.cl/noticias/161890/las-estrategias-para-combatir-la-expansion-del-coronavirus-en-el-mundo>
6. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 2021;13(2):202.
7. Ministerio de Salud de Chile. Decreta Alerta Sanitaria por el periodo que se señala y otorga facultades extraordinarias que indica por Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII)

- por brote del nuevo coronavirus (2019-NCOV). [www.bcn.cl/leychile](http://www.bcn.cl/leychile). 2020 [citado 8 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>
8. Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufekci Z, Fisman D, Schooley R. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *The Lancet*. 1 de mayo de 2021;397(10285):1603-5.
  9. Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol Pharm*. 2021;18(3):754-71.
  10. Nussbaumer-Streit B, Mayr V, Dobrescu AI, Chapman A, Persad E, Klerings I, et al. Quarantine alone or in combination with other public health measures to control COVID-19: a rapid review. *Cochrane Infectious Diseases Group*, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020 [citado 8 de junio de 2021]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013574.pub2>
  11. Koo D, Traverso H, Libel M, Drasbek C, Tauxe R, Brandling-Bennett D. El cólera epidémico en América Latina de 1991 a 1993: implicaciones de las definiciones de casos usadas en la vigilancia sanitaria. *Rev Panam Salud Publica*. 1997;1:85-92.
  12. Laval R E, Ferreccio R C. Fiebre tifoidea: Emergencia, cúspide y declinación de una enfermedad infecciosa en Chile. *Revista chilena de infectología*. 2007;24(6):435-40.
  13. Valenzuela B MT, Salinas P H, Cárcamo I M, Cerda L J, Valdivia C G. Estrategias para el enfrentamiento del cólera: La experiencia chilena desde una perspectiva de salud pública. *Revista chilena de infectología*. octubre de 2010;27(5):407-10.
  14. Wolff R M. Cambios epidemiológicos en las enfermedades infecciosas en Chile durante la década 1990-2000: 1990-2000. *Revista médica de Chile*. 2002;130(4):353-62.
  15. Luciani L, Ninove L, Zandotti C, Nougairède A. COVID-19 pandemic and its consequences disrupt epidemiology of enterovirus meningitis, South-East France. *Journal of Medical Virology*. abril de 2021;93(4):1929.
  16. Jy T, Ep C, Xyj S, Lei W, Mk A, I V. Public health measures during COVID-19 pandemic reduced hospital admissions for community respiratory viral infections. *The Journal of hospital infection*. 2020 [citado 9 de junio de 2021];106(2). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32730772/>
  17. Chiu N-C, Chi H, Tai Y-L, Peng C-C, Tseng C-Y, Chen C-C, et al. Impact of Wearing Masks, Hand Hygiene, and Social Distancing on Influenza, Enterovirus, and All-Cause Pneumonia During the Coronavirus Pandemic: Retrospective National Epidemiological Surveillance Study. *Journal of Medical Internet Research*. 2020 [citado 9 de junio de 2021];22(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7471891/>
  18. Choe YJ, Lee J-K. The Impact of Social Distancing on the Transmission of Influenza Virus, South Korea, 2020. *Osong Public Health Res Perspect*. junio de 2020;11(3):91-2.
  19. Ministerio de Salud de Chile. Decreto N°7, Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia. *Ley Chile - Biblioteca del Congreso Nacional*. 2020 [citado 14 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1141549>
  20. Instituto de Salud Pública de Chile. Sistema Interactivo de resultados de vigilancia de laboratorio. *Reporte Mensual*. 2021 [citado 16 de junio de 2022]. Disponible en: [https://vigilancia.ispch.gob.cl/app/reporte\\_mensual](https://vigilancia.ispch.gob.cl/app/reporte_mensual)
  21. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de virus respiratorios. 2021 [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/virusrespiratorios/>
  22. Redlberger-Fritz M, Kundi M, Aberle SW, Puchhammer-Stöckl E. Significant impact of nationwide SARS-CoV-2 lockdown measures on the circulation of other respiratory virus infections in Austria. *Journal of Clinical Virology*. abril de 2021;137:104795.
  23. Nisa I, Qasim M, Yasin N, Ullah R, Ali A. *Shigella flexneri*: an emerging pathogen. *Folia Microbiol*. 1 de abril de 2020;65(2):275-91.
  24. Ministerio de Salud de Chile. *Boletín Epidemiológico Trimestral. EPI - Departamento de Epidemiología*. 2019 [citado 13 de septiembre de 2021]. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/boletin-epidemiologico-trimestral-edicion4-2019/>
  25. Ministerio de Salud de Chile. *Listeriosis. EPI - Departamento de Epidemiología*. [citado 1 de septiembre de 2021]. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/listeriosis/>
  26. Kuo S-C, Tsou H-H, Wu H-Y, Hsu Y-T, Lee F-J, Shih S-M, et al. Nonpolio Enterovirus Activity during the COVID-19 Pandemic, Taiwan, 2020 - Volume 27, Number 1—January 2021 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. 2021 [citado 9 de junio de 2021]; Disponible en: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/1/20-3394\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/1/20-3394_article)
  27. K P, A M, M K, G O, S M, Jp M, et al. The potential long-term impact of the COVID-19 outbreak on patients with non-communicable diseases in Europe: consequences for healthy ageing. *Aging clinical and experimental research*. 2020 [citado 8 de junio de 2021];32(7). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32458356/>