

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UN AISLADO COLOMBIANO DE
Leptospira santarosai Y EVALUACIÓN DE SU DINÁMICA DE INFECCIÓN EN
EL MODELO EXPERIMENTAL *Mesocricetus auratus*: APORTES AL
CONOCIMIENTO DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA EN COLOMBIA**

HAROLD EDUARDO DURANGO GALVÁN

**Trabajo de grado para optar al título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis**

Asesora

PIEDAD AGUDELO FLÓREZ

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
MEDELLÍN**

2012

Caracterización genética de un aislado colombiano de *Leptospira santarosai* y evaluación de su dinámica de infección en el modelo experimental *Mesocricetus auratus*: aportes al conocimiento de la leptospirosis humana en Colombia

Genetic characterization of an isolate of *Leptospira santarosai* Colombian and evaluation of the dynamics of infection in the experimental model *Mesocricetus auratus*: contributions to knowledge of human leptospirosis in Colombia

Harold Durango¹, Diego Aranzazu², Juan David Rodas², Piedad Agudelo-Flórez³

¹ Estudiante MSc. Escuela de Microbiología y Bioanálisis Universidad de Antioquia e Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES, Sabaneta, Colombia.

² Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Colombia.

Introducción. La leptospirosis, zoonosis re-emergente causada por especies del género *Leptospira*, se presenta como síndrome febril indiferenciado, de comienzo súbito; en algunos casos con manifestaciones clínicas de severidad, como ictericia progresiva, insuficiencia renal o hemorragia pulmonar. Se hace necesario conocer la virulencia y patogenicidad de aislados de *Leptospira* de origen colombiano para

orientar las estrategias de investigación sobre diagnóstico, inmunoprevención y tratamiento.

Objetivo. Genotipificar una cepa colombiana de *Leptospira* aislada de un humano con síndrome de Weil y evaluar en el modelo experimental *Mesocricetus auratus* la dinámica de infección del aislado.

Metodología. Se realizó la valoración de la dosis letal media en hámster intraperitonealmente inoculados. Igualmente se identificaron los patrones de química clínica y se determinó la duración de la leptospiremia, la leptospiruria y los hallazgos histopatológicos comparados con los presentados en el mismo modelo con la cepa *L. interrogans* (Fiocruz L1-130).

Resultados. La tipificación molecular reveló que el aislado corresponde a la especie patógena *L. santarosai*. La bacteria fue recuperada, en el modelo hámster, a partir de riñón y pulmón, y fue detectada por PCR-LipL32 desde el día 3 p.i. en tejido pulmonar y renal. Se encontró aumento de la proteína C reactiva en los animales al día 5 p.i. con una baja significativa al día 18. Los biomarcadores a nivel renal mostraron alteraciones compatibles con una posible disfunción renal, asociada con falla pre-renal. Los cambios histopatológicos más frecuentes fueron la neumonía intersticial con diferentes grados de hemorragia y la nefritis intersticial.

Conclusión. Se identifica por primera vez en Colombia la presencia de la especie patógena *L. santarosai* de patogenicidad comparable desde el punto de vista de los aspectos histopatológicos de tropismo a pulmón y riñón con la cepa Fiocruz L1-130 de *L. interrogans* de reconocida virulencia y tropismo pulmonar. La dinámica de la infección mostró patrones semejantes a los presentados en casos

humanos con formas severas de la enfermedad, incluyendo los procesos hemorrágicos en pulmón. Este estudio plantea las bases para proponer evaluaciones de la respuesta inmune, tratamientos y candidatos a vacuna usando un aislado de origen local nunca antes evaluado en un modelo experimental bajo estos aspectos biológicos.

Palabras clave: *Leptospira santarosai*, leptospirosis, virulencia, modelo animal, histopatología, dosis letal media, genotipificación.

Introduction. Leptospirosis, re-emerging zoonosis caused by species of the genus *Leptospira*, is presented as undifferentiated febrile illness of sudden onset, in some cases with severe clinical manifestations such as progressive jaundice, renal failure or pulmonary hemorrhage. It is necessary to know the virulence and pathogenicity of *Leptospira* isolates from Colombia to guide research strategies on diagnosis, treatment and immunoprevention.

Objective. Colombian strain genotyping of *Leptospira* isolated from a human with Weil's syndrome and evaluate experimental model *Mesocricetus auratus* infection dynamics alone.

Methodology. Evaluation of the median lethal dose in hamsters inoculated intraperitoneally. Also identified in these animals the patterns of clinical chemistry and determined the duration of leptospiremia the leptospiruria and pathological findings compared with those presented en the same model with the strain *L. interrogans* (Fiocruz L1-130).

Results. Molecular typing revealed that the isolated corresponds to the pathogenic species *L. santarosai*. The bacterium was recovered in the hamster model, from kidney and lung, and was detected by PCR-LipL32 from day 3 p.i. lung and kidney

tissue. They found increased C-reactive protein in animals at day 5 p.i. with a significant drop at day 18. Biomarkers in the kidney showed changes consistent with possible renal dysfunction associated with pre-renal failure. Histopathological changes were interstitial pneumonia with varying degrees of hemorrhage and interstitial nephritis.

Conclusion. Identify for the first time in Colombia the presence of the pathogenic species *L. santarosai* pathogenicity comparable in terms of histopathological features of tropism to lung and kidney strain *L. interrogans* of Fiocruz L1-130 of known virulence and pulmonary tropism. The dynamics of infection showed patterns similar to those reported in human cases with severe forms of the disease, including lung hemorrhagic processes. This study sets out the basis for proposing assessments of the immune response, treatment and vaccine candidates using a single local source never tested in an experimental model under these biological aspects.

Key words. *Leptospira santarosai*, leptospirosis, virulence, animal model, histopathology, median lethal dose, genotyping.

Introducción

La leptospirosis, es una de las enfermedades infecciosas zoonóticas más extendidas en el mundo, comúnmente asociada a áreas urbanas y rurales de zonas tropicales y subtropicales. La infección es producida por especies patógenas del género *Leptospira*, que consiste en un grupo diverso de 20 especies entre las que se encuentran siete saprófitas o de vida libre, cinco de patogenicidad intermedia y ocho especies claramente patógenas para humanos y hospederos susceptibles (1).

La infección en el humano se produce por el contacto directo de piel o mucosas con la orina de animales salvajes o domésticos infectados que actúan como reservorios, o por contacto indirecto con orina en ambientes contaminados mediante exposición ocupacional, recreativo-deportiva o posterior a inundaciones y desastres (2).

En el humano la enfermedad puede cursar con manifestaciones clínicas variables, que van desde una infección subclínica (asintomática o enfermedad febril indiferenciada con cefalea y mialgias) hasta una forma severa caracterizada por ictericia progresiva, falla renal y pulmonar, alteraciones neurológicas y hemorragias, lo cual caracteriza el Síndrome de Weil que puede ser fatal en 10 a 15% de los casos (1). El compromiso pulmonar es una característica emergente de la enfermedad, descrita a partir de la epidemia en Nicaragua en 1995 (3) y posteriormente también caracterizada en Brasil (4, 5), Argentina (6, 7) y Perú (8) donde se reportan mortalidades entre el 30 al 60%.

La leptospirosis se ha registrado en diferentes regiones de Colombia en forma de brotes (9) y también en población general donde la enfermedad se presenta en forma endémica (10-14). Se sabe que en zonas urbanas del Urabá antioqueño, la enfermedad se presenta en población general (10, 13). En un estudio realizado en 591 personas, en el año 1998, se registró una prevalencia general del 12,5% (74/591), (IC 95% = 10,03 – 15,37%) para la región de Urabá. Seis de los nueve municipios de la región registraron personas con anticuerpos contra *Leptospira*, detectados por inmunofluorescencia indirecta, siendo los de mayor porcentaje Carepa (27,3%), Necoclí (25%) y San Pedro de Urabá (25%) y seguidos en orden de frecuencia por Apartadó (14,8%), Turbo (11,8%) y Chigorodó (7,5%). Por la

prueba de Microaglutinación (MAT) resultaron positivas el 12,3% (73/591) de las personas evaluadas. La distribución de positivos por serovar fue mayor para *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*. Adicionalmente fueron detectados por MAT anticuerpos contra los serovares Pomona, Hardjo, Bratislava y Canicola, evidenciando una epidemiología pecuaria y peridoméstica. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la seropositividad por edad, sexo, raza, oficio, años de residencia en la zona y características de la vivienda, lo cual podría asociarse con un riesgo de tipo ambiental que afecta a toda la población sin discriminar riesgos específicos (10).

En un estudio realizado en 652 habitantes del municipio de Necoclí y publicado en 2008 (13), se determinó por MAT una seroprevalencia de leptospirosis del 35,6%. En 198 casos (87%) se detectaron anticuerpos positivos para la serovariedad *Icterohaemorrhagiae*, en 20 (8,7%) para Hardjo y en 10 (4,3%) para Bratislava. Con respecto al síndrome hemorrágico pulmonar, la forma emergente de la enfermedad, se han reportado desde el año 2006 ocho casos confirmados de leptospirosis asociados con esta forma clínica en la zona del Urabá antioqueño. (Arboleda M, comunicación personal, 12 de septiembre, 2009).

Adicionalmente, cuando se revisan los datos de notificación al sistema nacional de vigilancia (Sivigila, Instituto Nacional de Salud-Colombia) durante el año 2010, se evidencia un panorama en ascenso de la leptospirosis en Colombia. En ese año se registraron 2.261 casos de leptospirosis humana, con un promedio de 43 casos por semana epidemiológica. Al comparar la notificación durante los años 2009 y 2010, se observa un incremento de 29% de casos para el último año, siendo que el 54% de éstos fueron confirmados por laboratorio. Los departamentos con mayor

número de casos confirmados fueron Bolívar, Atlántico y Antioquia. La incidencia nacional, teniendo en cuenta sólo los casos confirmados del año 2010 se encuentra en 1,68 casos por 100.000 habitantes.

Del panorama que se presenta con los reportes para población general de la zona de Urabá, la observación de casos con manifestaciones pulmonares y la notificación oficial del año anterior, se puede inferir un crecimiento de la leptospirosis en áreas suburbanas, áreas de invasiones rurales y semi-rurales, donde las fuentes de infección podrían ser tanto especies silvestres como roedores sinantrópicos. Es necesario describir las diversas especies patógenas de *Leptospira* posiblemente albergadas en estos ambientes, y llevar a cabo la descripción minuciosa de sus características biológicas tales como virulencia, patogénesis, e importancia para la salud humana y animal.

Durante la última década en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES (ICMT-CES) se han obtenido 12 aislamientos de *Leptospira* spp de humanos, animales y fuentes ambientales. Uno de estos aislados ha sido clasificado hasta el nivel de serovariedad como *L. interrogans* correspondiente al ST 17 Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (15), gracias al uso de secuenciamiento directo de múltiples locus (MLST por sus siglas en inglés). Igualmente se dispone de 9 de los 11 restantes, los cuales corresponden a especies patógenas de *Leptospira*. Esta última clasificación se llevó a cabo por medio de reacción en cadena de la polimerasa para un gen exclusivo de leptospirosis patógenas (PCR-gen *lipL32*) (16).

A pesar de que la leptospirosis representa una prioridad mundial por su condición de re-emergencia epidemiológica y clínica, poco se sabe de los aislados

procedentes de pacientes colombianos, desconociéndose además, su genotipificación, virulencia y patogenicidad. Por las limitantes que tiene el estudio de virulencia y patogénesis en series de casos humanos, los modelos animales de leptospirosis posibilitan profundizar en el conocimiento de estos eventos. El hámster es un modelo de utilidad en la investigación de leptospirosis y se ha empleado en diversos estudios(17-25). Este estudio presenta la genotipificación por secuencia directa del gen *lipL32* de una cepa colombiana de *Leptospira* aislada de un humano con síndrome de Weil, y la evaluación en el modelo experimental *Mesocricetus auratus* de la dinámica de infección del aislado a través de la valoración de la dosis letal media (DL₅₀), patrones de química clínica, leptospiremia, leptospiruria y hallazgos histopatológicos comparados con los presentados en el mismo modelo con la cepa de referencia *L. interrogans* Fiocruz L1-130.

Materiales y métodos

Cepas de *Leptospira* spp

Cepa de referencia: *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni cepa L1-130 donada por la Fundación FIOCRUZ, Brasil; fue aislada de un paciente durante el brote de leptospirosis asociado a la inundación en Salvador, Brasil, en 1996 y desde entonces ha sido utilizada principalmente para estudios de patogenicidad en modelos animales (26-29).

Origen del aislado colombiano (Cepa JET): Esta bacteria fue obtenida en el año 2008 del cultivo positivo de un paciente de sexo masculino, de 13 años, procedente de la ciudad de Apartadó, que consultó al ICMT-CES por un cuadro

febril de tres días de evolución consistente en fiebre, cefalea, malestar general, prurito ocular, con importante inyección conjuntival, conjuntiva tarsal “empedrada”, “ronchas perioculares”, edema bpalpebral bilateral, adenomegalias cervicales, tos persistente, sin signos meníngeos, con aparición de algunas petequias al realizar la prueba del torniquete y con antecedente de haberse bañado en quebrada, 10 días antes de presentar los síntomas. Se le tomaron muestras para prueba serológica IgM para *Leptospira* y sangre con anticoagulante para cultivo en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, EMJH (DIFCO). La prueba serológica fue reportada como positiva y al paciente se le prescribió doxiciclina 200 mg/día por 14 días. En la revisión del cuarto día de tratamiento refirió disminución de la cefalea y del malestar general. En la revisión al final del tratamiento se le encontró asintomático y en buen estado. El cultivo fue revisado semanalmente bajo microscopía de campo oscuro y fue reportado como positivo después de cuatro semanas, confirmando el diagnóstico de leptospirosis.

El cultivo positivo se separó en dos tubos con medio líquido EMJH suplementado con 10% de medio de enriquecimiento comercial (DIFCO) los cuales fueron incubados entre 28 y 30°C en condiciones de aerobiosis. El primer tubo fue incubado durante dos semanas y fue usado para extracción de material genético para fines de genotipificación. El segundo fue mantenido aproximadamente seis meses mediante repiques cada dos semanas (30), antes de ser usado en los ensayos biológicos.

Genotipificación del aislado Colombiano de *Leptospira*

Extracción de ADN genómico

El ADN fue extraído con un kit comercial Wizard ADN de Promega®, siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas, utilizando como volumen inicial 1ml de cultivo del aislado (crecimiento 0,5 MacFarland). Después de la extracción se rehidrató el ADN con buffer Tris-EDTA, y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción molecular se realizó con los iniciadores descritos por Levett et al (31), *lipL32/270F* (5'-GCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') y *lipL32/692R* (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), dirigidos a una región ubicada entre las posiciones 270 y 692 del gen, la cual codifica para la lipoproteína LipI32. Esta secuencia es conservada en las especies patógenas de *Leptospira*. El perfil térmico de la PCR fue estandarizado por Moreno y Agudelo (2010) (16) con una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, una fase de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos y posteriormente una fase de extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos. En el proceso de la PCR se usaron 35µl como volumen final de la reacción, 3,5µl de *taq* buffer PCR (KCl y MgCl₂) a una concentración 1X, 4,2µl de MgCl₂ a una concentración de 3,0 mM, 3,5 µl de cada uno de los primers (forward and reverse) a una concentración 0,1 µM, 0,875 µl de dNTP a una concentración 0,25 mM y 0,28 µl de *Taq* polimerasa con una concentración de 1U/µl y adicionando 5 µl de ADN.

Electroforesis y secuencia

El producto de la PCR, se visualizó utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa con una concentración de 1,5%. Se usó buffer TBE (Tris- Base, EDTA, ácido bórico) a una concentración de 1X, fue revelado con Bromuro de Etidio y se le agregó un marcador de peso molecular de 50pb; posteriormente se realizó la corrida electroforética a 80V durante 1 hora en cámara de electroforesis horizontal y por último se visualizó en un analizador de imagen Epichemi³. El producto obtenido fue enviado a secuenciar por métodos estándares a MACROGEN – Corea. La secuencia obtenida fue comparada con aquellas disponibles en la base de datos de GenBank.

Infección experimental

Preparación del cultivo para inóculo

Una alícuota de un tubo de cultivo de cada aislado (con aproximadamente 1 a 2 semanas de repicado en medio EMJH), se revisó entre lámina y laminilla en el microscopio de campo oscuro para la evaluación de viabilidad y movilidad antes de ser usado como base para la preparación del inóculo. La concentración del inóculo se ajustó inicialmente a 0,5 en el patrón de turbidez de McFarland equivalente a 10^5 bacterias/ mL, en un espectrofotómetro del VitecK II (Biomérieux) y se usó como solución calibradora medio EMJH estéril. A partir de la suspensión de 10^5 bacterias/ mL se realizaron diluciones seriadas de 1mL de solución del cultivo inicial en 9 mL de medio EMJH estéril, para así obtener las concentraciones de cada inóculo desde 10^4 , 10^3 y 10^2 bacterias por mL.

Reactivos biológicos

Se utilizaron como reactivos biológicos machos y hembras de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 45 a 60 g de peso, procedentes y mantenidos en el Bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, a una temperatura de 18-22 °C, humedad relativa del 50–70%, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, alimentados con concentrado comercial de Agrinal “Rodentina” extruida y autoclavada.

Todas las condiciones y procedimientos siguieron las guías internacionales para el manejo y cuidado de los animales (32). Todos los experimentos fueron aprobados mediante acta # 51 del 18 de mayo de 2009 por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la SIU.

Reactivación de cepas de *Leptospira* spp

Para fines de reproducibilidad y estandarización, y previo al inicio de los ensayos experimentales, las dos cepas de *Leptospira* fueron reactivadas de la siguiente forma. Por cada cepa se realizó una inoculación en dos hámsteres sirios de 1 mL de una suspensión a una concentración bacteriana mayor a 10^8 bacterias/ mL. Cuando los animales presentaban mal estado general eran anestesiados (Ketamina/xilacina a dosis de 200/10 mg/kg de peso) y sangrados para recuperación del aislado en medio de cultivo EMJH. Cien μ L de esta sangre fueron disueltos en 400 μ L de solución salina estéril para inyectarse a un nuevo hámster. Este procedimiento se repitió dos veces más, en períodos de dos semanas, para la reactivación de la virulencia de los aislados. A los aislados así recuperados se les realizaron dos nuevos pasajes *in vitro* en el medio EMJH. De esta forma estuvieron listos para ser usados en la infección experimental.

Valoración de la dosis letal media (DL₅₀)

Se estimó cuantitativamente la virulencia de las cepas en el modelo hámster sirio mediante la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) según la metodología propuesta por Fajardo et al (33). Grupos de tres hámsteres fueron inoculados por vía intraperitoneal con diluciones seriadas (10⁴, 10³ y 10² Bacterias/mL) de cada una de las cepas a evaluar. Los animales fueron monitoreados diariamente y durante 28 días post infección (p.i.) para observar la presentación de signos clínicos de enfermedad, incluyendo deshidratación, pelaje erizado, decrecimiento de la actividad, aislamiento o muerte. Los animales control negativo fueron inoculados con los mismos volúmenes de medio EMJH estéril. Cada dosis se evaluó en nueve animales, en tres momentos diferentes, empleando tres animales en cada momento. El cálculo de la DL₅₀ se realizó apoyados en la metodología propuesta por la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) en “Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423” (34).

Comportamiento de la infección en el modelo animal

Se llevó a cabo la evaluación del comportamiento de la infección en el hámster durante un tiempo determinado, tanto para la cepa de referencia Fiocruz L1-130 como para la cepa colombiana JET. Éste comportamiento se determinó según la virulencia de las dos cepas evaluadas por parámetros clínicos, detección de la infección en pulmón, riñón, sangre (bacteriemia) y orina (bacteriuria), la detección de anticuerpos específicos para *Leptospira* por la técnica de MAT, niveles en suero de Proteína C Reactiva, BUN, Urea y Creatinina, y por los hallazgos anatómicos e histopatológicos en pulmón y riñón. Para ello se infectó por cada grupo de evaluación y por cada cepa, tres hámsteres sirios y un hámster control

negativo, bajo las condiciones ya señaladas y con el inóculo resultante de la valoración hecha en la DL_{50} determinada en el experimento anterior (10^3 Bacterias/mL). Se definieron 14 puntos de evaluación comprendidos desde 2, 4, 8, 14, 24, 48, 72, 96 horas y 5, 10, 15, 18, 21 y 28 días p.i.. Los hámsteres control negativo fueron inoculados con 1 mL de medio de cultivo EMJH estéril.

Determinación de signos clínicos: Los animales fueron monitoreados dos veces al día durante el tiempo del experimento para evaluar la presencia de signos clínicos, incluyendo deshidratación, pelaje erizado, decrecimiento de la actividad y aislamiento. Cuando los animales presentaban tres o más de éstos signos, este momento fue considerado como punto final del experimento y se procedía a anestésarlos (Ketamina/xilacina a dosis de 200/10 mg/kg de peso) y luego a bañar el cuerpo del animal con una solución de amonio cuaternario para desinfección y toma de muestra sanguínea, con y sin anticoagulante, por punción cardíaca; aplicándoles posteriormente la eutanasia (cámara de CO_2). Por razones de optimización de la muestra y dada la baja cantidad de sangre que se puede recuperar de cada hámster (500 - 700 μ l) se definieron puntos variables de evaluación en los diferentes individuos para establecer el comportamiento de infección sanguínea.

Detección de infección en pulmón y riñón: La necropsia comenzó por la cavidad torácica y finalizó por la cavidad abdominal. En cada caso se hizo una descripción macroscópica del estado de los órganos blanco (pulmón y riñón), y se realizaron los cortes de tejido correspondientes. Una porción de cada tejido fue depositada en formol tamponado al 10%, otra porción fue depositada en solución salina para extracción de material genómico para realizar seguimiento molecular

por la PCR-LipL32 y una última porción se utilizó para macerar y sembrar en medio líquido EMJH libre de antibióticos el cual fue incubado en condiciones de aerobiosis entre 28 y 30 °C y evaluado por cuatro semanas de seguimiento al microscopio de campo oscuro.

Detección de bacteriemia: Una muestra de sangre equivalente a dos o tres gotas, fueron inoculadas en medio líquido EMJH libre de antibióticos el cual fue incubado en condiciones de aerobiosis entre 28 y 30 °C y evaluado por cuatro semanas de seguimiento al microscopio de campo oscuro con el fin de determinar la leptospiremia.

Detección de leptospiruria: la muestra de orina fue obtenida por drenaje de la vejiga mediante punción directa al momento de la realización de la necropsia. La extracción del DNA se realizó utilizando el kit DNeasyBlood&Tissue Kit (Quiagen); la reacción molecular de PCR se realizó como se describió anteriormente.

Detección de anticuerpos específicos para *Leptospira*: El suero fue recuperado por centrifugación a 15.000 rpm a partir de la sangre obtenida sin anticoagulante. Este se conservó en congelación a -20°C, hasta el momento del procesamiento. Una alícuota se utilizó para determinación de anticuerpos por la prueba serológica de microaglutinación (MAT), de acuerdo a las especificaciones de la OMS (30), usando como antígeno la cepa utilizada en la infección experimental en cada caso. Fue considerado como punto de corte de positividad un título igual o superior a 1:50.

Determinación de parámetros de química sanguínea: Una alícuota de suero se usó para determinación de marcadores de respuesta inflamatoria (Proteína C reactiva) y perfil renal (Urea, BUN y Creatinina). Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Veterinaria y Zootecnia del ICMT-CES.

Análisis histológico: Las porciones de riñón y pulmón conservadas en formol tamponado al 10% se procesaron por técnicas histológicas convencionales haciéndoles cortes de 5 μ m de espesor, con micrótomo de rotación. Todas las muestras se colorearon con Hematoxilina Eosina (H-E) para determinar cambios histopatológicos y se les realizó además coloración de Warthin Starry (W-S) por métodos estándares para establecer la presencia de formas compatibles con *Leptospira* spp en tejidos (35).

Resultados

Genotipificación del aislado Colombiano de *Leptospira*

La PCR con iniciadores para el gen *lipL32* permitió tipificar el aislamiento bacteriano como perteneciente a alguna de las especies patógenas de *Leptospira*, mediante la amplificación de un fragmento de 423 pb entre las posiciones 270 y 692. Al realizar el análisis comparativo de la secuencia directa de este gen, con las secuencias de *Leptospira* disponibles en la base de datos del GenBank, se obtuvo un porcentaje de identidad del 100%, con la especie *L. santarosai* (Tabla 1). En la figura 1a se presenta el resultado de la electroforesis del producto de PCR-LipL32 y en la figura 1b el cromatograma correspondiente a la secuencia realizada.

Caracterización de la infección en el modelo experimental tanto para la cepa colombiana como para la cepa de referencia:

Valoración de la dosis letal media (DL₅₀): Los animales inoculados con la cepa de referencia L1-130 presentaron pérdida de la constitución corporal, apariencia ictericia de sus mucosas y deshidratación severa, muriendo entre los días 5 y 7 p.i. Se determinó de esta forma que la DL₅₀ correspondía a un número entre 10² (alrededor de 70% de supervivencia) y 10³ (35-40% supervivencia) bacterias por mL. Esto significa que se requieren más de 100 y menos de 1000 leptospiras para causar la muerte al 50 % de la población de animales inoculados (Figura 2).

En el caso del grupo inoculado con la cepa de *Leptospira* colombiana el signo clínico observado fue la ictericia de mucosas, evidenciada después del día 15 p.i. No se presentó mortalidad en ninguno de los grupos inoculados con las diferentes concentraciones de esta cepa durante el período de 28 días de seguimiento.

Bacteriemia: Los cultivos de sangre resultaron positivos al día cinco p.i. para la cepa Fiocruz L1-130 y al día tres y seis p.i. para la cepa colombiana JET.

Leptospiruria: La PCR realizada a las muestras de orina tomadas a las 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas p.i. arrojaron resultados negativos.

Comportamiento de anticuerpos: La respuesta serológica fue evidenciada como positiva tanto para la cepa Fiocruz L1-130 como para la cepa colombiana JET, desde el día 6 p.i. manteniéndose positiva hasta el día 21 de seguimiento. Se observa una tendencia a títulos mayores con la cepa colombiana en comparación con la cepa Fiocruz L1-130, en una razón de 4/1 para el día 6 y 2/1 para el día 15 y 21 post infección (Tabla 2).

Análisis de parámetros de química clínica: Los parámetros normales para las diferentes pruebas en los hámster fueron definidos mediante valoraciones previas, bajo las condiciones de manejo y alimentación establecidas en el bioterio de la SIU (Veterinario Alejandro Daza, comunicación personal, 24 de noviembre, 2009) y teniendo en cuenta el trabajos de Hernández (2009) (36). Para la valoración de los resultados del presente trabajo, se verificó que los valores encontrados en el control negativo (animal no inoculado), se encontraran dentro de los rangos establecidos previamente como normales. Los resultados de los parámetros evaluados para el grupo inoculado con la cepa colombiana JET mostraron variadas alteraciones con respecto al control en los días 5 y 18 p.i. En el caso del marcador de respuesta inflamatoria, la proteína C reactiva presentó al día 5 p.i. un aumento en todos los animales, que van de 2 a 7,5 veces por encima del valor límite. En siete de los nueve animales inoculados con la cepa JET, se encontró una tendencia a la disminución para el día 18 p.i. mientras que en dos animales los valores fueron superiores a los registrados el día 5 p.i.

En cuanto a los marcadores de perfil renal los niveles de úrea fueron mayores en cinco de los nueve animales, encontrando aumentos que van de 1,1 a 1,8 veces por encima del valor límite al día 5 p.i. (HJET-8 28,8 mg/dl y HJET-1 49,01 mg/dl) y al día 18 p.i. se encontró que todos los animales inoculados con la cepa JET tenían valores que oscilaban entre 1,5 y 2 veces por encima del valor límite (HJET-7 38,52 mg/dl y HJET-6 53,71 mg/dl), lo cual fue semejante para los hallazgos del BUN. Sin embargo los niveles de creatinina permanecieron dentro de los rangos normales (Tabla 3). No se presentan resultados de los parámetros

de química sanguínea de animales inoculados con la cepa de referencia debido a que estos morían antes del tiempo establecido para su evaluación.

Comportamiento en la invasión de *Leptospira* en tejidos de pulmón y riñón

Los cultivos de tejido de riñón fueron positivos el día 5 p.i. tanto para la cepa Fiocruz L1-130 como para la cepa colombiana JET. En el caso de los cultivos de pulmón del grupo inoculado con la cepa colombiana, estos fueron positivos (uno de tres animales inoculados) en los días 6 y 7 p.i. no obteniéndose cultivos positivos después del día 10 p.i. Del grupo inoculado con la cepa Fiocruz no se obtuvieron cultivos positivos de este órgano en ninguno de los puntos evaluados.

Dada la sensibilidad variable del cultivo para el seguimiento de invasión a órganos, se realizó adicionalmente evaluación de la invasión por coloración W-S y por PCR-lipL32. La coloración de W-S fue positiva en riñón para la cepa Fiocruz L1-130 y para la colombiana desde el día 5 p.i. coincidiendo con la recuperación obtenida por cultivo (Tabla 4). Por su parte la PCR fue positiva para las dos cepas evaluadas en pulmón y riñón desde el día 3 p.i.

Comportamiento en el daño a órganos determinada por histopatología

Descripción macroscópica de los tejidos de pulmón y riñón

La revisión macroscópica realizada durante las necropsias de punto final de algunos animales mostró en los dos grupos experimentales signos de hemorragia pulmonar, ictericia en tejidos y alteración de la forma del riñón. La figura 3 muestra la presencia de estos hallazgos para cada una de las cepas evaluadas experimentalmente.

Descripción microscópica de los tejidos de pulmón y riñón

Daño en pulmón

La evaluación del comportamiento para la cepa Fiocruz L1-130 a nivel del pulmón fue realizada por la coloración de H-E desde las 2, 4, 8, 14, 24, 48, 72 y 96 horas mostró neumonía intersticial desde formas leves evidenciadas a las 2 horas de evaluación hasta formas moderadas y estas se mantuvieron hasta la evaluación de las 24 horas p.i. En el caso de la cepa JET se presentó neumonía intersticial moderada desde el primer momento de evaluación (2 horas p.i.) hasta las 96 horas p.i. La tabla 5 y la figura 4 muestran la presencia de estos hallazgos para cada una de las cepas evaluadas experimentalmente.

Daño en riñón

La evaluación del comportamiento para la cepa Fiocruz L1-130 a nivel del riñón fue realizada por la coloración de H-E desde las 2, 4, 8, 14, 24, 48, 72 y 96 horas mostró congestión leve multifocal con necrosis tubular leve multifocal evidenciada a las 2 horas de evaluación hasta llegar a formas severas a las 24 horas p.i. En el caso de la cepa JET colombiana se evidenció inicialmente (2 horas p.i.) congestión multifocal leve, llegando hasta necrosis tubular multifocal desde las 4 horas hasta la evaluación de las 96 p.i. La tabla 6 y la figura 5 señalan estos hallazgos. En la tabla 7 se muestran los hallazgos histopatológicos en riñón a los 5 y a los 18 dpi.

Discusión

Este artículo presenta la genotipificación y la evaluación de la dinámica de infección de un aislado de *L.santarosai*, especie de reconocida patogenicidad (1), obtenida de un paciente colombiano y nunca antes registrada para Colombia. Esta especie fue propuesta como nueva por Yasuda *et al* 1987, basado en análisis

fenotípicos y de la homología de su material genético (ADN). La especie toma su nombre en honor a Carlos A. Santa Rosa, veterinario brasileño, pionero en el estudio de la leptospirosis en su país. Los serogrupos que se registran dentro de esta especie son Shermani, Hebdomanis y Tarassovi. La cepa tipo (LT 821) fue aislada de rata semiespinosa (*Proechimys semispinosus*) procedente de la zona del canal de Panamá (37).

En un estudio posterior, Brenner *et al* 1999 (38), confirman y amplían estos hallazgos y presentan 65 cepas pertenecientes a *L. santarosai* originarias en su mayoría de Norte y Sur América y en menor número de China. En este estudio, se evidencia que 22 de estas cepas fueron aislados de humanos, siendo 21 de éstas de origen Americano y 14 de estas cepas específicamente de Panamá.

Se dispone en la literatura de pocos reportes de enfermedad en humanos ocasionada por *L. santarosai*. Yang *et al* (2001) reportan 12 casos de pacientes procedentes de Taiwan con síndrome de Weil y ocasionados por el serovar Shermani (39). También en Taiwan Lin *et al* (2008) registran 23 casos de leptospirosis por *L. santarosai* serovar Shermani con síntomas respiratorios en 63% de los casos (40). Posteriormente Valverde *et al* (41), reportan el aislamiento, de fuente humana con síndrome de Weil, de una cepa de *L. santarosai* procedente de Costa Rica. Por la distribución geográfica centroamericana y del Caribe de esta especie de *Leptospira* se puede inferir un origen geográfico similar para el aislado colombiano. Este hallazgo es de gran importancia epidemiológica ya que permite aproximarse a conocer las cepas que circulan en áreas colombianas y caracterizar la enfermedad que se produce en pacientes procedentes de áreas como el Urabá antioqueño. Igualmente, este aislado está disponible para que futuros estudios

identifiquen antígenos útiles en la producción de vacunas a partir de cepas autóctonas.

La evaluación biológica del aislado colombiano frente al de referencia en el modelo experimental hámster, muestra que a diferencia de la cepa Fiocruz L1-130, la cepa colombiana JET no produjo signos clínicos de severidad en el modelo de hámster, lo cual podría relacionarse con la presencia de infecciones subclínicas que se presentan de forma regular en los pacientes de la zona de Urabá, lo cual es evidenciado con los títulos de anticuerpos encontrados en los pobladores de la región; esto también se podría ver reflejado en el infrecuente diagnóstico y reporte de casos (2). A pesar de esto, al hacer el análisis de los resultados de los biomarcadores de química clínica, se encontró aumento en los niveles séricos de proteína C reactiva, la cual es sintetizada en el hígado en respuesta a procesos infecciosos, inflamatorios y de injuria tisular, y participa en procesos de inmunomodulación, como la amplificación de la capacidad del complemento, la opsonización de bacterias y la estimulación de células fagocíticas (42, 43).

En la evaluación de los marcadores de función renal se observó elevación modesta de los niveles de úrea sérica y BUN mientras que los niveles de creatinina se encontraron normales, lo cual se presenta en casos de falla pre-renal o en casos ligeros de afectación del parénquima renal o necrosis cortical no muy marcada (44-46). Todas estas alteraciones son características de la infección en humanos por especies patógenas de *Leptospira* productoras del clásico síndrome de Weil, en el cual la infección bacteriana genera cambios a nivel de hígado y riñón, considerados como los principales órganos blanco en la patogénesis de la enfermedad (42, 44-46).

Como se evidencia en los hallazgos histopatológicos también se demuestra la capacidad invasiva de la cepa colombiana, al observarse neumonía intersticial, acompañada de hemorragia alveolar y bronquiolar con diferente grado de severidad y nefritis intersticial con necrosis tubular; estos hallazgos son comparables a los presentados por los animales inoculados con la cepa de referencia Fiocruz L1-130. En general estos hallazgos demuestran que aunque la cepa no conduce signos de severidad evidentes sí genera cambios significativos en los órganos blanco. Cuando se comparan estos hallazgos histopatológicos con otros registrados en la literatura, se ve al igual que lo reportado por Nally *et al* en cobayos (47) y Areal *et al* en humanos (48), en donde se presentaron cambios histopatológicos sin signos clínicos de enfermedad.

Estos mismos hallazgos histopatológicos han sido publicados por otros autores a partir de estudios en varios modelos experimentales al utilizar diferentes especies patógenas de *Leptospira*, donde se evidencian estos cambios inoculando la bacteria a diferentes concentraciones, las cuales van desde DL₅₀ con menos de 10 bacterias para las más patógenas, hasta concentraciones de 10⁸ bacterias para las menos patógenas, dependiendo no solo de la cepa sino también del modelo animal utilizado.

En la tabla 8 se presenta una revisión de la literatura que en forma comparativa ilustra y amplía los hallazgos histopatológicos obtenidos tanto en el modelo hámster como en otros modelos experimentales. Por ejemplo, los estudios realizados en *M. auratus* y *Callithrix jacchus*, con especies de reconocida patogenicidad de diferentes orígenes y bajo diferentes concentraciones de inóculo, mostraron lesiones a nivel pulmonar que van desde congestión intersticial y

moderado infiltrado inflamatorio hasta neumonía intersticial con hemorragia alveolar de variado grado de severidad y a nivel de riñón, lesiones que van desde congestión glomerular y túbulo intersticial, con necrosis tubular aguda hasta una nefritis intersticial de variada severidad, hallazgos semejantes a los encontrados en este estudio en el modelo hámster al inocular la cepa de *L. santarosai* (18, 49-54).

Arean *et al* (48) describen en las necropsias de casos fatales humanos, diferentes grados de compromiso pulmonar, particularmente las caracterizadas por áreas de hemorragia, edema y congestión alveolar, semejante a lo encontrado en el presente estudio a nivel del modelo hámster con la cepa colombiana JET.

También fue demostrada la capacidad invasiva de *L. santarosai* en hámsteres mediante la coloración de Warthin Starry, siendo positiva tanto en pulmón como en riñón de animales infectados con la cepa colombiana JET, además del aislamiento en cultivo a partir del macerado de estos órganos y la positividad por PCR-lipL32, lo cual se puede asociar directamente con las alteraciones encontradas en las evaluaciones macroscópicas y microscópicas de los diferentes órganos estudiados en algunos modelos animales (29, 52). Aunque en la mayoría de los trabajos reportados en la literatura ha sido difícil la recuperación de *Leptospira* a partir del tejido pulmonar, sí demuestran a través de inmunohistoquímica la presencia de antígeno de la bacteria en las lesiones del tejido pulmonar, con lo que se sugiere una acción directa de los microorganismos o sus productos en la generación de las lesiones observadas en el síndrome de hemorragia pulmonar originada por leptospirosis (55, 56).

Este daño en el tejido pulmonar es explicado a través de dos mecanismos: la producción de sustancias tóxicas por el microorganismo, tales como endotoxinas, las cuales median la vasculitis capilar que es la causa demostrada de hemorragia pulmonar o por citoquinas producidas por las células del hospedero producto de la inducción de la respuesta inmune por parte del patógeno, o incluso ambas causas; de aquí que los cambios en los tejidos evaluados pueden ser explicados por el incremento de la respuesta inflamatoria, la posible expresión de mediadores como los productos de la iNOS que al igual que la endotoxina bacteriana puede estar relacionada con el daño a nivel del endotelio vascular (57).

En un estudio realizado por Croda *et al* (2010), apoyados en pruebas de histopatología e inmunohistoquímica a partir de tejido pulmonar de pacientes que fallecieron con síndrome pulmonar hemorrágico por leptospirosis, se encontraron depósitos de inmunoglobulinas y fracción C3 del complemento en la superficie de los alvéolos, lo cual junto con la sobreproducción de los derivados del óxido nítrico explican el daño a nivel de los vasos sanguíneos y la infiltración celular que lleva a neumonía intersticial con edema franco y hemorragia (17).

Se observó una respuesta de inflamación aguda en el pulmón de los hámsteres infectados con *L. santarosai*, con hemorragia pulmonar que varía en severidad. Los resultados obtenidos en los diferentes tiempos pos-infección son consistentes con lo encontrado por otros autores en diferentes modelos animales utilizando otras especies patógenas (48, 56, 57) y con la fisiopatología que se presenta en algunas series de casos en humanos, como en el estudio de 12 casos humanos realizado por Yang *et al* (2001) en Taiwan, en el cual se demostró el compromiso pulmonar, renal y hepático desencadenado por la especie patógena, *L. santarosai*

(39). De igual modo, Lin *et al* (2008), en su serie de 23 casos de leptospirosis por *L. santarosai*, llaman la atención sobre la elevada frecuencia de compromiso pulmonar (63%) y destacan un patrón de compromiso radiológico definido como múltiples densidades nodulares; así mismo tres de estos pacientes presentaron síndrome de Weil (40).

La valoración serológica, realizada a través de la determinación de los títulos de anticuerpos mediante la técnica de MAT, determinó que aunque ambas cepas inducen la producción de anticuerpos a partir del día 6 p.i. en algunos casos, los títulos tienden a ser mayores en algunos animales inoculados con la cepa JET en comparación con los inoculados con la cepa de referencia Fiocruz L1-130. Este hallazgo podría sugerir cómo la modulación de la respuesta inmune probablemente está determinando la presentación de signos clínicos y por consiguiente la evolución final de la enfermedad (28, 39, 43).

A medida que evolucionaba el proceso infeccioso se determinó la reducción en la severidad de las lesiones en el pulmón con lo cual se sugiere el inicio de la resolución del proceso de inflamación, aunque las lesiones alveolares persistían con hemorragia alveolar y pocas áreas de edema. Posiblemente los hallazgos histopatológicos de congestión y leve hemorragia pulmonar podrían estar involucrados en los cuadros de leptospirosis que se presentan en la región del Urabá, aunque la resolución o agravamiento de los mismos podrían depender de otros factores de especie y de individuo no reflejados apropiadamente por el modelo (28, 57); sin embargo como lo demuestra un estudio realizado durante el año 2010, donde el 41,1% (63/153) de los pacientes con leptospirosis del eje bananero presentaron tos, el 30,7% (47/153) congestión nasal y 10 casos

refirieron hemoptisis durante su cuadro agudo (Arboleda M, comunicación personal, noviembre 12 de 2011, datos sin publicar).

En conclusión se identifica por primera vez en Colombia la presencia de la especie patógena *L.santarosai*, la cual arrojó una identidad de 100 % al compararla con las secuencias reportadas en GenBank para el gen *lipL32*. Se presentó daño histopatológico en pulmón y riñón al igual que con la cepa Fiocruz L1-130 de *L. interrogans* de reconocida virulencia y tropismo pulmonar. Los patrones histopatológicos en la infección con *L. santarosai* fueron semejantes a los reportados por otros autores en casos humanos con formas severas de la enfermedad (39).

Este estudio sienta las bases para evaluaciones de tratamiento y de respuesta inmune de la leptospirosis humana en modelo animal mundialmente empleado, para estudiar e intentar explicar el comportamiento clínico variable que tiene la leptospirosis en nuestro medio y que apoyados en la respuesta inmune que inducen nuestras cepas, poder llegar a la implementación de pruebas de evaluación de parámetros inmunológicos que permitan predecir a tiempo posibles complicaciones, además, de lograr orientar y establecer el manejo terapéutico más apropiado. Teniendo en cuenta que *L. santarosai* es una cepa nativa que nunca se había evaluado en un modelo experimental bajo estos aspectos biológicos; se señala la importancia de usar aislados propios de *Leptospira* para la evaluación de candidatos a vacunas, evaluación de terapia antimicrobiana e implementación de métodos de diagnóstico y seguimiento con mayor sensibilidad y especificidad.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Financiación

Este estudio recibió financiación del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, Colombia (Cod325645221265 - 352-2008) y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES.

Bibliografía

1. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M.** Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Micro.* 2009;7(10):736-47.
2. **Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA,** et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003 Dec;3(12):757-71.
3. **Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ,** et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis.* 1998 Nov;178(5):1457-63.
4. **Ko AI, Reis MG, Dourado CM, Johnson WD, Riley LW.** Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet.* 1999;354(9181):820-5.
5. **Silva JJP, Manhães de Carvalho JE, Xavier MM, Lutz TM, Setúbal S, Dalston MO.** Forma pulmonar grave da leptospirose (FPGL): uma nova apresentação clínica da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivos Brasileiro de Medicina.* 1998;72:169-71.
6. **Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigo B,** et al. Distres respiratorio debido a hemorragia pulmonar por leptospirosis. *MEDICINA (Buenos Aires).* 2002;62:135-40.
7. **Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigo B,** et al. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):1004-5.
8. **Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H,** et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis.* 2005 Feb 1;40(3):343-51.
9. **Epstein PR, Calix Pena O, Blanco Racedo J.** Climate and disease in Colombia. *Lancet.* 1995 Nov 11;346(8985):1243-4.
10. **Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo B, Arboleda-Naranjo M.** Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2007;23(9):2094-102.
11. **Ferro B, Rodríguez A, Pérez M, Travi B.** Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomedica.* 2006;26:270 -7.
12. **Góngora A, Parra J, Aponte L, Gómez L.** Seroprevalencia de *Leptospira* spp . en Grupos de Población de Villavicencio, Colombia. *Revista de Salud Pública.* 2008;10:269-78.
13. **Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castaneda E, Galeano A, Puerta H,** et al. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Oct;9(5):483-90.
14. **Sebek Z, Sixl W, Valova M, Marth E, Kock M, Reinthaler FF.** Serological investigations for leptospirosis in humans in Columbia. *Geogr Med Suppl.* 1989;3:51-60.
15. **Szonyi B, Agudelo-Florez P, Ramirez M, Moreno N, Ko AI.** An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *Vet J.* 2011 May;188(2):237-9.
16. **Moreno N, Agudelo-Flórez P.** Aplicacion de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):548-56.
17. **Croda J, Neto A, Brasil A, Pagliari C, Nicodemo A, Duarte M.** Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:593-9.

18. Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun*. 2011;Nov; 79 (11):4480-92.
19. Seixas F, da Silva E, Hartwig D, Cerqueira G, Amaral M, Fagundes M, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*. 2007;Dec 21: 26 (1):88-95.
20. Faisal S, Yan W, Chen C, Paliannapan R, McDonough S, Chang Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*. 2008;Jan 10: 26 (2):277-87.
21. Griffith M, Moon J, Johnson E, Clark K, Hawley J, Hospenthal D, et al. Efficacy of fluoroquinolones against *Leptospira interrogans* in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;Jul: 51 (7):2615-7.
22. Moon J, Rivard R, Griffith M, Ressler R, McCall S, Reitstetter R, et al. Effect of timing and duration of azithromycin therapy of *Leptospirosis* in a hamster model. *J Antimicrob Chemother*. 2007;Jan: 59 (1):148-51.
23. Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2006;Jul: 74 (7):4172-9.
24. Faisal S, Yana W, McDonough S, Mohammeda H, Diversc T, Changa Y. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 2009;Oct 19: 27 (44):6129-36.
25. Vernel-Pauillac F, Goarant C. Differential Cytokine Gene Expression According to Outcome in a Hamster Model of *Leptospirosis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4 (1):e582.doi: 10.1371/journal.pntd.0000582.
26. **Atzingen MV, Goncales AP, De Moraes ZM, Araujo ER, De Brito T, Vasconcellos SA**, et al. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol*. 2010 Sep;59(Pt 9):1005-15.
27. **Lourdault K, Aviat F, Picardeau M**. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 2009 May;58(Pt 5):648-55.
28. **Pretre G, Olivera N, Cedola M, Haase S, Alberdi L, Brihuega B**, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the pathogenesis of experimental leptospirosis. *Microb Pathog*. 2011 Sep;51(3):203-8.
29. **Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM**, et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 2008 Jul 23;26(31):3892-6.
30. **World Health Organization**. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003 [updated 2003; cited 04/04/2011]; Available from: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/leptoguidelines2003.pdf>.
31. **Levett P, Morey R, Galloway R, Turner D, Steigerwaltand A, Mayer L**. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative J *Med Microbiol*. 2005;54:45-9.
32. **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**. Guía para cuidado y uso de animales de experimentación. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias Buenos Aires-Argentina. 2002.
33. **Fajardo EM, Ortiz B, Chavez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y**, et al. [Standardization of the lethal dose 50% of *Leptospira interrogans* strains used in the control of the leptospirosis cuban vaccine for human use]. *Rev Cubana Med Trop*. 1998;50(1):22-6.
34. **Organization for Economic Cooperation and Development-OECD**. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Environmental Health and Safety; 2001 [updated 2001; cited julio 17 de

2009]; 423:[1-14]. Available from:
http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf.

35. **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** *Leptospira y leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia MediSci; 1999.
36. **Hernández Y.** Manejo y sujeción de roedores utilizados en el laboratorio. Morelia: Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2009.
37. **Yasuda P, Steigerwalt A, Sulzer K, Kaufmann A, Rogers F, Brenner D.** Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37:407-15.
38. **Brenner D, Kaufmann A, Sulzer K, Steigerwalt A, Rogers F, Weyant R.** Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:839-58.
39. **Yang C, Wu M, Pan M.** Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;5(16):73-7.
40. Lin P, Chi C, Ho M, Chen C, Ho C, Wang J. Demographic and clinical features of leptospirosis: three-year experience in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;Apr; 41 (2):145-50.
41. **Valverde M, Ramírez J, Montes de Oca L, Goris M, Ahmed N, Hartskeerl R.** Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infect Genet Evol*. 2008;8(5):529-33.
42. **Covic A, Maftei ID, Gusbeth-Tatomir P.** Acute liver failure due to leptospirosis successfully treated with MARS (molecular adsorbent recirculating system) dialysis. *Int Urol Nephrol*. 2007;39(1):313-6.
43. **Prietoa M, Kilsteina J, Bagileta D, Pezzottob S.** Proteína C reactiva como factor pronóstico de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos. *Med Intensiva*. 2008;32 (9):424-30.
44. **Abdulkader R, Silva M.** The kidney in leptospirosis. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:2111-20.
45. **Covic A, Goldsmith D, Gusbeth-Tatomir P, Seica A, Covic M.** A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1128-34.
46. **Durmaz Cetin B, Ozlem Harmankaya M, Hasman H, Gunduz A, Oktar M, Seber E.** Acute Renal Failure: A Common Manifestation of Leptospirosis. *Renal Failure*. 2004;26(6):655-61.
47. **Nally J, Chantranuwat C, Wu X, Fishbein M, Pereira M, Pereira J, et al.** Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol*. 2004;164(3):1115-27. .
48. **Arean V.** The Pathologic Anatomy and Pathogenesis of Fatal Human Leptospirosis (Weil's Disease). *Am J Pathol*. 1962;40(4):393-423.
49. Diniz J, Félix S, Bonel-Raposo J, Seixas A, Vasconcellos F, Grassmann A, et al. Highly virulent *Leptospira borgpetersenii* strain characterized in the hamster model. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;Aug; 85 (2):271-4.
50. **Cao Y, Faisal SM, Yan W, Chang YC, McDonough SP, Zhang N, et al.** Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. *Vaccine*. 2011;29(43):7379-86.
51. **Marinho M, Oliveira-Júnior IS, Monteiro CM, Perri SH, Salomão R.** Pulmonary disease in hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(5):832-6.

52. **Pereira M, Pereira J, Pinto M, França da silva M, Machado M, Lenzi H**, et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(1):13-20.
53. **Srikram A, Wongratanacheewin S, Puapairoj A, Wuthiekanun V, Sermswan RW**. Analyses of vaccination protocols for *Leptospira interrogans* serovar autumnalis in hamsters. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(5):779-86.
54. Zhang Y, Lou X, Yang H, Zhang X, Guo X, He P, et al. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis*. 2012;Jan 25; 12 (1):20. [Epub ahead of print].
55. **Alves V, Siqueira S, Pestana C**. Patología da leptiopirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 1989;49:75-80.
56. **Nicodemo A, Duarte M, Alves V, Takakura C, Santos R, Nicodemo EL**. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56(2):181-7.
57. **Marchiori E, Lourenco S, Setúbal S, Zanetti G, Gasparetto T, Hochegger B**. Clinical and Imaging Manifestations of Hemorrhagic Pulmonary Leptospirosis: A state-of-the-Art Review. *Lung*. 2011;189:1-9.

Tabla 1. Análisis de la secuencia del gen *lipL32* de la cepa colombiana JET de acuerdo con la base de datos de secuencias del GenBank.

Arrojó una puntuación máxima de 532, con puntuación total de 532, cobertura de consulta del 99%, valor E de 4e-148 y una máxima identidad de 100% con las siguientes secuencias:

Adhesión	Descripción
HQ709387.1	<i>L.santarosai</i> cepa Calderon-1 RNA ribosomal 16S, parcial
FJ154589.1	<i>L.santarosaiserovarBakeri</i> cepa LT 79 RNA ribosomal 16S, parcial
FJ154585.1	<i>L.santarosaiserovarAlexicepa</i> HS 616 RNA ribosomal 16S, parcial
FJ154584.1	<i>L.santarosaiserovarCanalzona</i> cepa CZ 288 RNA ribosomal 16S, parcial
FJ154583.1	<i>L.santarosaiserovarTropicacepa</i> CZ 299 RNA ribosomal 16S, parcial
AY461890.1	<i>L.santarosai</i> cepa LT79 RNA ribosomal 16S, parcial
AY461889.1	<i>L.santarosai</i> cepa LT821 RNA ribosomal 16S, parcial
AY461887.1	<i>L.santarosai</i> cepa CZ299 RNA ribosomal 16S, parcial
AY461885.1	<i>L.santarosai</i> cepa LT117 RNA ribosomal 16S, parcial
AY461884.1	<i>L.santarosai</i> cepa CZ288 RNA ribosomal 16S, parcial

Tabla 2. Comportamiento de los títulos de anticuerpos para las dos cepas evaluadas de *L. santarosai*JET y *L. interrogans*Fiocruz L1-130.

# Animal	Cepa inoculada	Días post infección			
		0	6	15	21
1	JET	Neg	N/A	1:200	N/A
2	JET	Neg	N/A	Neg	N/A
3	JET	Neg	N/A	1:200	N/A
4	JET	N/A	Neg	N/A	1:200
5	JET	N/A	1:200	N/A	1:200
6	JET	N/A	Neg	N/A	Neg
7	Fiocruz L1-130	Neg	N/A	1:100	N/A
8	Fiocruz L1-130	Neg	N/A	Neg	N/A
9	Fiocruz L1-130	Neg	N/A	N/A	N/A
10	Fiocruz L1-130	N/A	1:50	N/A	N/A
11	Fiocruz L1-130	N/A	Neg	N/A	1:100
12	Fiocruz L1-130	N/A	Neg	N/A	1:100

Neg: Negativo, N/A: no se realizó la medición.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de respuesta inflamatoria (Proteína C reactiva, Pcr) y del perfil renal al día 5 y 18 posinfección de hámster inoculados con la cepa colombiana de *L. santarosai*.

Hámster	Proteína CR (mg/L)		Creatinina (mg/dl)		BUN (mg/dl)		Úrea (mg/dl)	
Valor referencia	0,0 – 0,8		0,3 – 1,0		6 – 12		12 - 26	
Días post infección	5	18	5	18	5	18	5	18
No inoculado	0,3	0,8	0,30	0,40	5,6	7,5	12,00	16,05
H-JET-1	3,6	0,3	0,14	0,28	22,9	23,7	49,01	50,72
H-JET-2	2,6	1,7	0,12	0,33	3,2	18,7	16,85	40,02
H-JET-3	6,0	2,7	0,18	0,27	19,6	19,5	41,94	41,73
H-JET-4	1,7	2,8	0,05	0,30	5,6	21,5	11,98	46,01
H-JET-5	3,3	2,9	0,18	0,33	19,6	19,8	41,94	42,37
H-JET-6	2,3	2,1	0,20	0,39	15,6	25,1	33,48	53,71
H-JET-7	2,8	2,5	0,34	0,52	10,9	18,0	23,30	38,52
H-JET-8	4,4	5,5	0,24	0,46	13,5	23,0	28,80	49,28
H-JET-9	5,0	4,3	0,31	0,49	11,0	22,3	23,50	47,72

dpi: días post infección, Proteína CR: Proteína C reactiva, BUN: Nitrógeno ureico en sangre.

Tabla 4. Resultados de los cultivos y coloración de Warthin Starry a partir de pulmón y riñón de animales inoculados con las cepas *L. santarosai* JET y *L. interrogans* Fiocruz L1-130.

Días post infección	<i>Leptospira santarosai</i> (JET)				<i>Leptospira interrogans</i> (L1-130)			
	Cultivo		WS		Cultivo		WS	
	Pulmón	Riñón	Pulmón	Riñón	Pulmón	Riñón	Pulmón	Riñón
5	- (3/3)	+ (1/3)	- (3/3)	+ (1/3)	- (2/2)	+ (2/2)	- (2/2)	+ (2/2)
6	+ (1/3)	- (3/3)	- (3/3)	- (3/3)	N/A	N/A	N/A	N/A
7	+ (1/3)	- (3/3)	- (3/3)	- (3/3)	N/A	N/A	N/A	N/A
9	- (3/3)	- (3/3)	+ (1/3)	- (3/3)	N/A	N/A	N/A	N/A
15	- (3/3)	+ (2/3)	- (3/3)	- (3/3)	- (1/1)	+ (1/1)	- (1/1)	- (1/1)
21	- (2/2)	+ (2/2)	- (2/2)	- (2/2)	- (2/2)	+ (1/2)	- (2/2)	- (2/2)
28	- (1/1)	+ (1/1)	- (1/1)	- (1/1)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A: no se realizó la prueba.

Tabla 5. Patrones de neumonía intersticial observados con coloración de H-E de acuerdo a la cepa inoculada *L. santarosai* JET y *L. interrogans* Fiocruz L1-130.

Tiempo post infección (horas)	Inoculado <i>L. santarosai</i> (JET)			Inoculado <i>L. interrogans</i> (L1-130)		
	Evolución	Distribución	Compromiso	Evolución	Distribución	Compromiso
2	Subaguda	Multifocal	Severo	Subaguda	Multifocal	Leve
4	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Multifocal	Moderado
8	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Multifocal	Moderado
14	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Multifocal	Moderado
24	Aguda	Multifocal	Leve	Subaguda	Multifocal	Moderado
48	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Multifocal	Severo
72	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Multifocal	Moderado
96	Subaguda	Multifocal	Moderado	Subaguda	Difuso	Moderado

Tabla 6. Hallazgos histopatológicos en riñón con coloración de HE de acuerdo a la cepa inoculada *L. santarosai* JET y *L. interrogans* Fiocruz L1-130

Tiempo post infección (horas)	Inoculado <i>L. santarosai</i> (JET)	Inoculado <i>L. interrogans</i> (L1-130)
2	Congestión leve multifocal	NT leve multifocal
4	NT leve multifocal	NT leve multifocal
8	NT moderada multifocal	NT moderada multifocal
14	NT moderada multifocal	NT moderada multifocal
24	NT severa multifocal	NT moderada multifocal
48	NT severa difusa	NT severa multifocal
72	NT severa multifocal	NT severa multifocal
96	NT severa multifocal	NT severa multifocal

NT: Necrosis tubular.

Tabla 7. Histopatología de riñón de animales inoculados con *L. santarosai* JET a los 5 y 18 días p.i.

# Caso	5 días post infección	# Caso	18 días post infección
1	CR moderada	5	CR moderada con cilindros hialinos
2	CR moderada	6	CR moderada multifocal, glomerulonefritis moderada multifocal y necrosis tubular leve multifocal
3	CR moderada con necrosis leve	7	CR moderada multifocal, glomerulonefritis moderada multifocal y necrosis tubular leve multifocal
4	CR leve	8	CR moderada multifocal, glomerulonefritis moderada multifocal con cilindros proteicos leves focales y necrosis tubular leve focal

CR: Congestión renal.

Tabla 8. Hallazgos histopatológicos en pulmón y riñón de modelos animales inoculados con diferentes concentraciones de cepas patógenas de *Leptospira*.

Especie	Serogrupo/Serovar	Cepa	País de Origen	Modelo animal	DL ₅₀ /inoculo	Hallazgo histopatológico	Referencia
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	-	Brasil	<i>Callithrix jacchus</i>	2,7X10 ⁶	Pulmón: Hemorragia intraalveolar con infiltrado inflamatorio intersticial. Riñón: Necrosis tubular aguda, nefritis intersticial	Pereira et al, 2005.
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	RY21	Tailandia	<i>Mesocricetus auratus</i>	158	Pulmón: Hemorragia alveolar con congestión intersticial y moderado infiltrado inflamatorio. Riñón: congestión glomerular y túbulo intersticial	Srikram et al, 2008.
<i>L. interrogans</i>	Icterohemorrhagiae	11437	Brasil	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ³	Pulmón: Discreta área de neumonía intersticial, congestión alveolar y pocos focos hemorrágicos aumentando de severidad en el tiempo	Marinho et al, 2009.
<i>L. interrogans</i>	Pomona	-	Canada	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ²	Pulmón: Edema e inflamación a nivel del septo alveolar. Con hemorragia alveolar	Cao et al, 2011.
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	L1-130	Brasil	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ²	Riñón: Nefritis túbulo intersticial con diferente grado de severidad	Pretre et al, 2011

<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	4E	Brasil	<i>Mesocricetus auratus</i>	5,18	Pulmón: Congestión y hemorragia con distinto grado de severidad. Riñón: Congestión y hemorragia, con necrosis y degeneración tubular y algunos casos de atrofia glomerular.	Alcoforado et al, 2011.
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Verdun	Francia	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ⁸ (DL ₁₀₀)	Pulmón: Edema y hemorragia alveolar con diferente grado de severidad Riñón: Congestión difusa asociado con hemorragias, sin nefritis intersticial.	Matsui et al, 2011.
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Lai	China	<i>Cavia porcellus</i>	5X10 ⁸	Pulmón: Hemorragia alveolar con diferente grado de severidad, leptospiras intactas y neumonía intersticial severa. Riñón: Necrosis tubular aguda con hemorragias extensas y túbulos renales llenos de eritrocitos.	Yan et al, 2012
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	L1-130	Brasil	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ³	Pulmón: Hemorragia alveolar y bronquial con neumonía intersticial aguda severa. Riñón: Congestión y necrosis tubular. Nefritis intersticial.	Presente trabajo
<i>L. santarosai</i>		JET	Colombia	<i>Mesocricetus auratus</i>	10 ³	Pulmón: Congestión y hemorragia alveolar y bronquial con neumonía intersticial con diferente grado de	Presente trabajo

						severidad. Riñón: Congestión y glomerulonefritis con necrosis tubular moderada.	
--	--	--	--	--	--	---	--

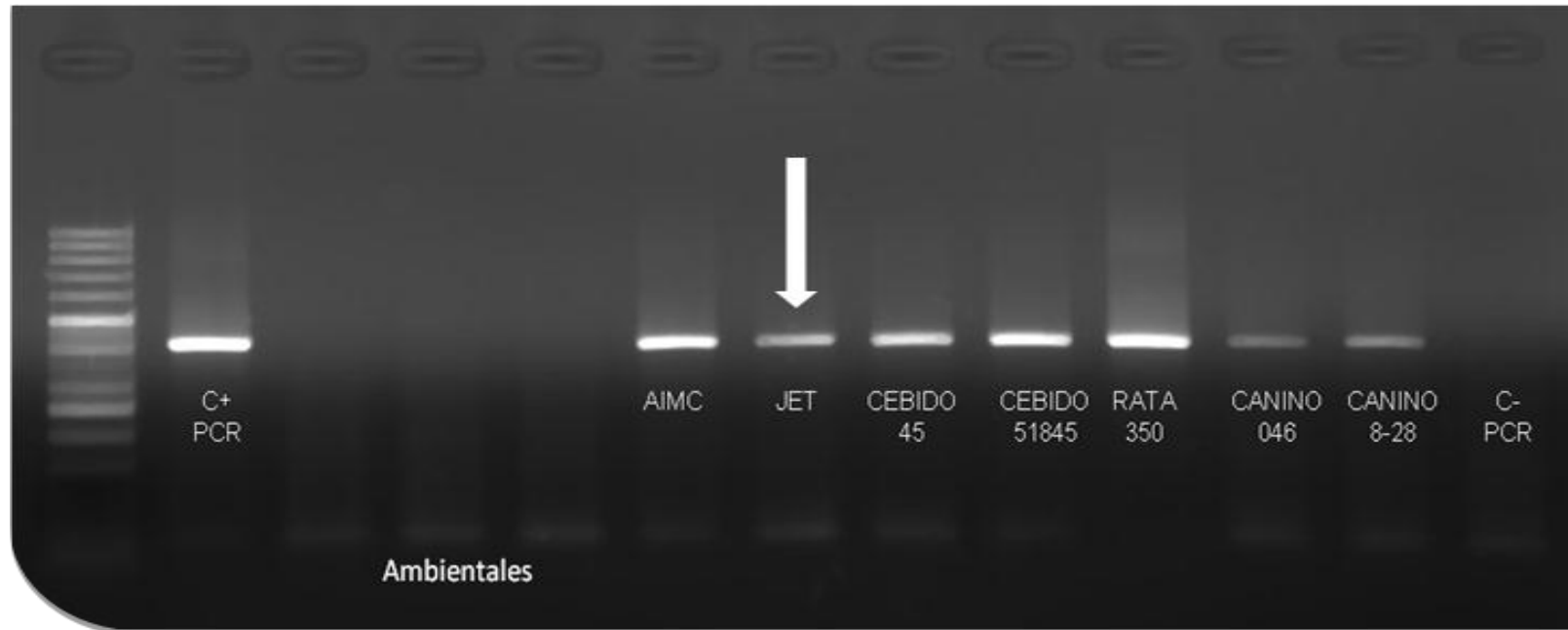


Figura 1a. Genotipificación de aislado colombiano de *L.santarosai* JET. **Electroforesis del producto de PCR**

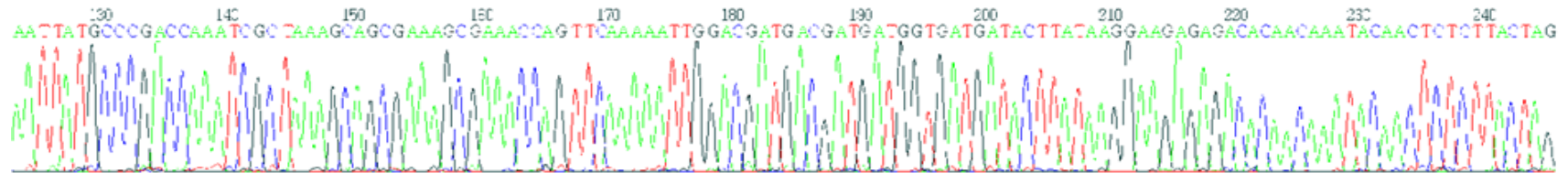
lipL32. Gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio. **Carril 1.** Marcador de peso molecular (50 bp). **Carril**

2. Control positivo de PCR obtenido de ADN de cultivo de *L. interrogans* Cepa Fiocruz L1-130. **Carril 3-12.** Muestras

de diferentes orígenes negativas y positivas para el gen *lipL32*. La flecha señala el producto de PCR del aislado

colombiano cepa JET. **Carril 13.** Control negativo.

Primer F



Primer R

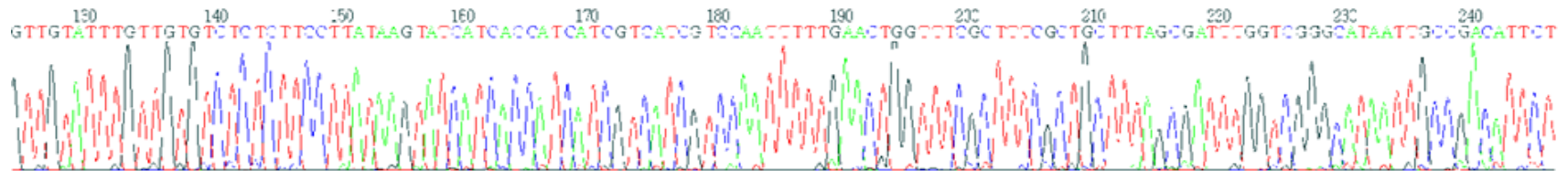


Figura 1b. Secuencia del producto de PCR *lipL32*. Cromatograma obtenido con los iniciadores sentido (Primer F) y antisentido (Primer R) de la especie *L. santarosai*.

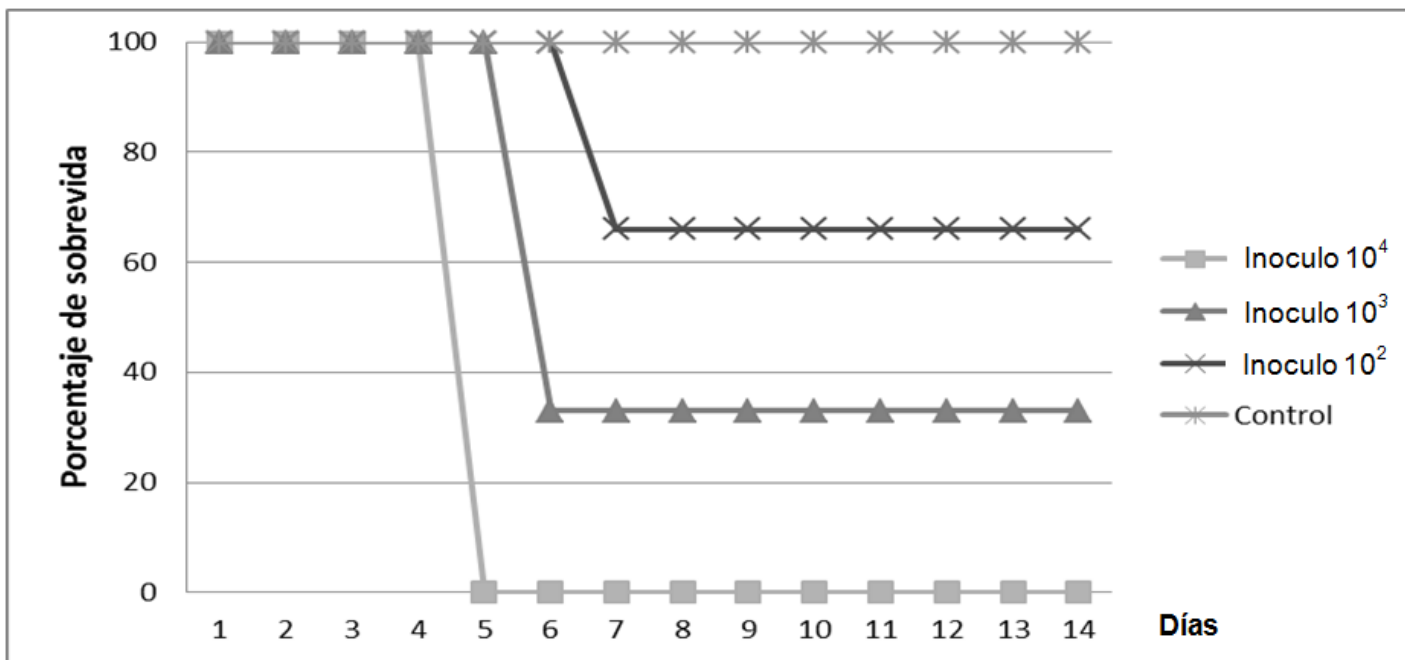


Figura 2. Resultados del experimento de la DL₅₀ de la cepa *L. interrogans* Fiocruz L1-130 presentando el porcentaje de sobrevivida por cada una de las tres dosis probadas. El grupo de sobrevivientes y el del control negativo fueron seguidos durante 28 días p.i.

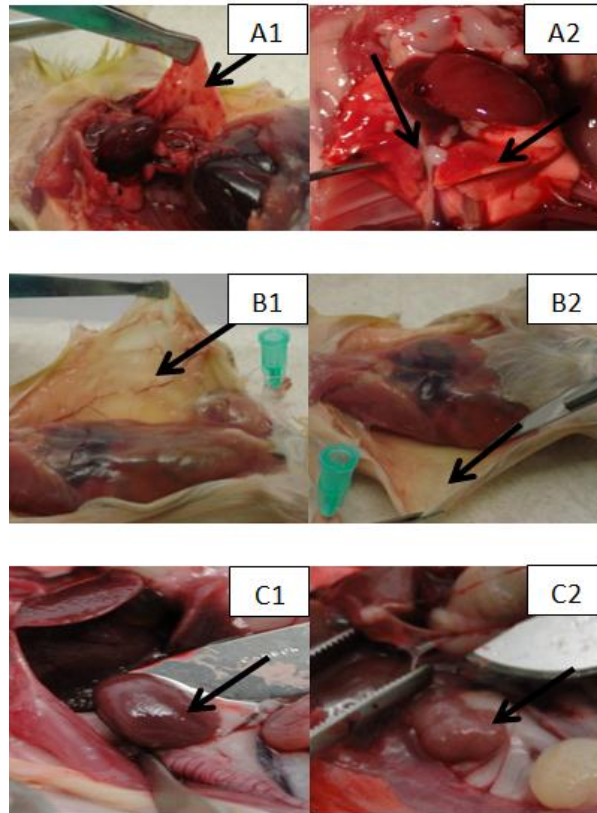


Figura 3. Hallazgos macroscópicos con inóculos mayores a 10^8 bacterias/mL: 1. Cepa *L. santarosai*JET a los 15 dpi, 2. Cepa *L. interrogans*Fiocruz L1-130 a los 5 dpi; A. Hemorragia pulmonar, B. Ictericia, C. Alteración de la forma del riñón.

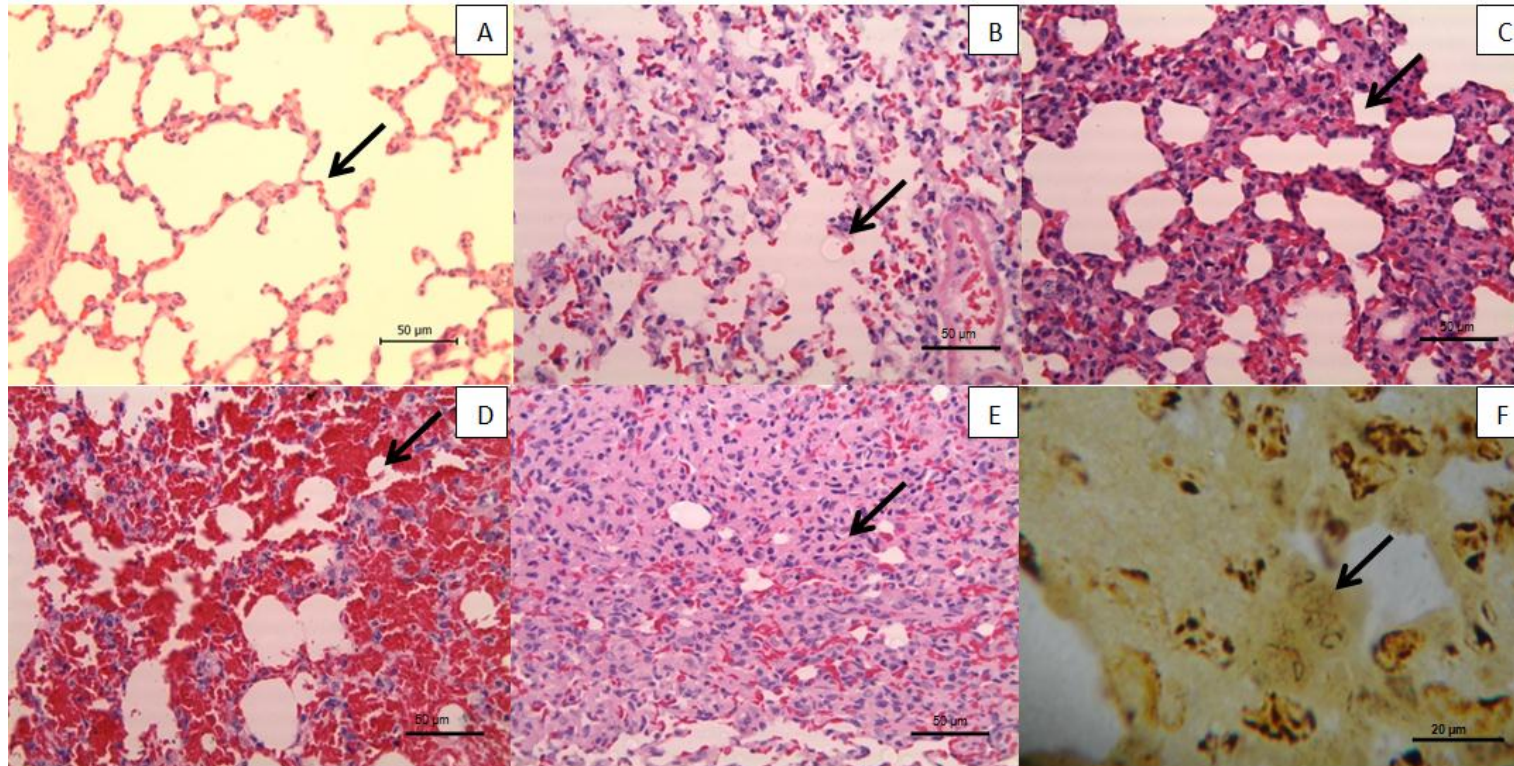


Figura 4. Pulmón, **A.** Control negativo: Se observan luces alveolares limpias y paredes alveolares delgadas. **B.** Caso L1-130-2h. Neumonía intersticial subaguda leve; se observa edema alveolar (cabeza de flecha), leve congestión e infiltrado inflamatorio en pared alveolar (flecha). **C.** Caso JET-4h. Neumonía intersticial aguda moderada; se observa edema, congestión e infiltración de neutrófilos moderada (flecha) en pared alveolar con disminución de luces alveolares. **D.** Caso JET-2h. Neumonía intersticial aguda severa con hemorragia alveolar severa, se observan abundantes eritrocitos en las luces de los alveolos e infiltrado de neutrófilos en intersticio. **E.** Caso L1-130-120h. Neumonía intersticial crónica severa, se observa fibrosis (flecha) e infiltrado inflamatorio en intersticio alveolar con disminución significativa de luces alveolares. H-E. 400X. **F.** Caso JET-144h. Evidencia de leptospiras en pared alveolar. Coloración de W-S 1000X.

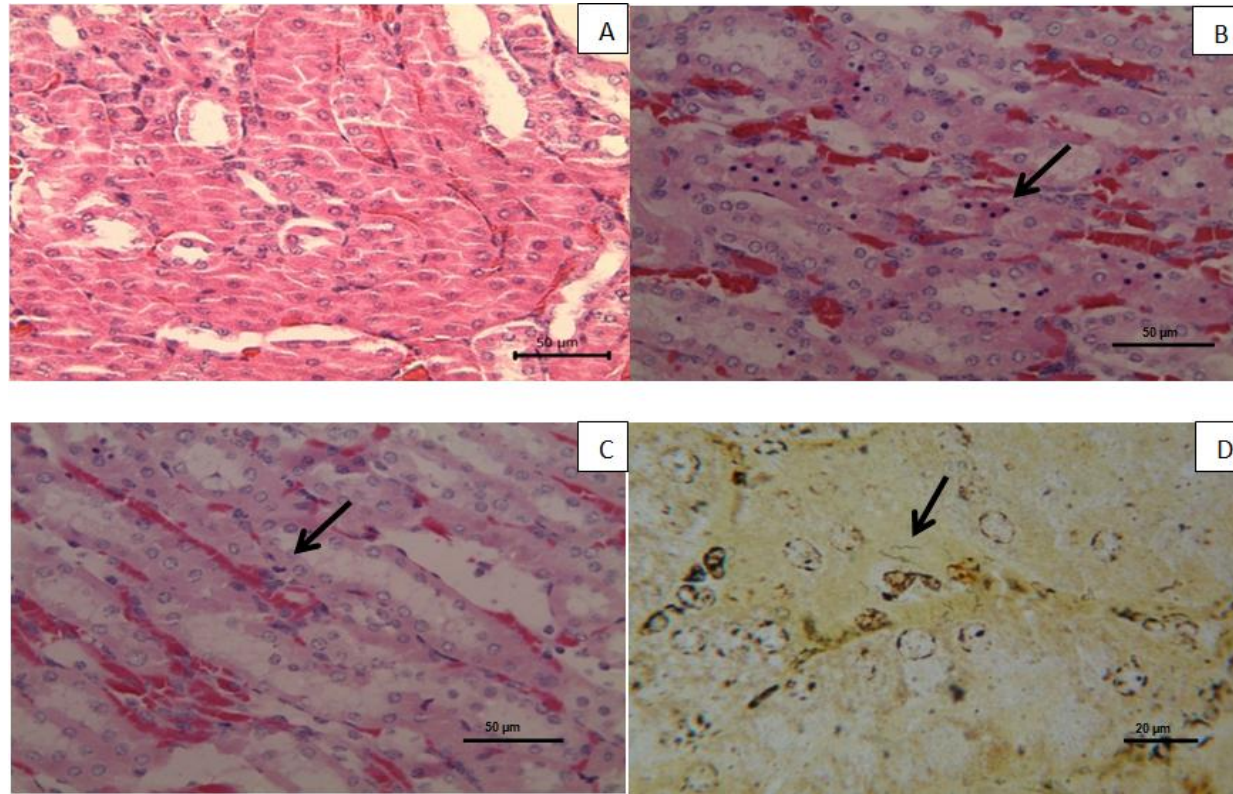


Figura 5. Riñón, **A.** Control negativo: Se observan túbulo proximales normales en corteza renal. **B.** Caso JET-8h. Necrosis tubular con congestión aguda, eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear (flecha). **C.** Caso L1-130-4h. Congestión moderada multifocal (flecha), con necrosis tubular leve. H-E. 400X. **D.** Caso JET-6h. Evidencia de leptospirosis en el intersticio renal. Coloración de W.S 1000X.