

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN ANALÍTICA DE UN SISTEMA
ELISA INDIRECTO BASADO EN LA UTILIZACIÓN DE LIPL32
RECOMBINANTE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS
CONTRA LEPTOSPIRAS PATÓGENAS EN SUEROS DE
PERROS**

T E S I S

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

CAROLINA OROZCO CABRERA

DIRECTOR

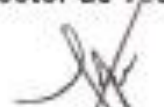
Dr. Francisco Javier Monge Navarro

La presente tesis “**DESARROLLO Y VALIDACIÓN ANALÍTICA DE UN SISTEMA ELISA INDIRECTO BASADO EN LA UTILIZACIÓN DE LIPL32 RECOMBINANTE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRAS PATÓGENAS EN SUEROS DE PERROS.**” realizada por **C. Carolina Orozco Cabrera**, dirigida por el **Dr. Francisco Javier Monge Navarro**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias



Dr. Francisco Javier Monge Navarro
Director de Tesis



Dr. Gilberto Lopez Valencia
Secretario



Dr. Héctor Manuel Acosta Valle
Sinodal



Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Sinodal



Dr. Sergio Arturo Gueto González
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Francisco Javier Monge por haberme aceptado en mis estudios de doctorado, así como guiarme durante la culminación de este.

A el Dr. Gilberto López Valencia por apoyarme como codirector de tesis agradezco todos sus consejos.

A el Dr. Sergio Arturo Cueto González por todo el apoyo.

A el Dr. José Carlomán Herrera, por su apoyo, así como sus recomendaciones.

A el Dr. Héctor Manuel Acosta Valle por su apoyo como asesor del proyecto.

A el Dr. Alberto Barreras Serrano por sus consejos y su apoyo.

Agradezco a todas y todos mis compañeros que me apoyaron en el desarrollo del proyecto y en especial a todos y cada uno de mis maestros.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi madre y a mi hijo, que han sido fuente de inspiración para realizarme como profesional.

Y a mi abuelo que siempre estará a nuestro lado en paz descansa.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABSTRACT.....	viii
RESUMEN GENERAL	ix
CAPÍTULO 1.....	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
II ANTECEDENTES	4
1. Leptospirosis.....	4
1.1 Etiología.....	5
1.2 Clasificación.....	7
1.3 Fisiopatología.....	9
1.4 Signos clínicos	11
1.5 Epidemiología.....	12
1.6 Diagnóstico	13
1.6 Prevención y Control.....	15
CAPÍTULO 2.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Localización y área de estudio	18
Diseño del estudio	18
Diseño de la proteína LipL32 recombinante (rLipL32)	19
Desarrollo y producción de antígenos recombinantes de LipL32	19
Procedimiento RT-PCR.....	20
Desarrollo del sistema ELISA indirecto rLipL32 para leptospirosis	21
Precisión del ELISA-rLipL32	22
Rango dinámico y linealidad del ELISA-LipL32	22
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN.....	31
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	32
CAPÍTULO 3.....	36
iii ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO	37

3-1 Development of an indirect ELISA based on baculovirus recombinant LipL32 protein antigen for the accurate and inexpensive diagnosis of canine leptospirosis	37
3.2 Prevalence and geographical distribution of Nosema apis and Nosema cerenae in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis	54
IV CONCLUSIÓN GENERAL	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Clasificación Leptospiras	8
Cuadro 2. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de <i>Leptospira</i>	20
Cuadro 3. Resultados del RT-PCR para muestras de sangre de perros capturados en el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali 2015.....	26
Cuadro 4. Relación Positiva / Negativa, experimentos de estandarización rLipL32....	28
Cuadro 5. Comparación Resultados RT-PCR con ELISA rLipL32.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Fotomicrografo de <i>Leptospira Spp</i>	5.
Fig. 2 Arquitectura de la membrana de <i>Leptospira</i>	7
Fig. 3 Transmisión de Leptospirosis.....	9
Fig. 4 Fases de la enfermedad y diagnóstico.....	10
Fig. 5 Formato de tablero empleado para estandarización de reactivos de ELISA rLipL32.....	23
Fig. 6 Curva de amplificación de muestras de sangre probadas por el sistema RT-PCR para <i>Leptospira</i>	25
Fig. 7 Muestras positivas a RT-PCR seleccionadas por tener las más altas fluorescencias relativas y probadas por medio de iELISA rLipL32 para utilizarse como control positivo, en contraste con Suero fetal (SF) utilizado como control negativo.....	26
Fig. 8 Gráficos comportamiento controles negativos y positivos.....	29
Fig. 9 Regresión lineal simple diluciones dobles de sueros.....	29
Fig. 10 Análisis Kappa RT-PCR – iELISArLipL32.....	30

ABSTRACT

Leptospira infects a wide range of companion, domestic, and wild animal species, shedding the spirochetes into the environment via urine. Dogs become infected by direct or indirect contact with wild or domestic infected animal reservoirs increasing the risk of zoonotic transmission of the disease. The microscopic agglutination test has been used as the gold standard for the diagnosis of leptospirosis but has low sensitivity and is technically complex. Several ELISAs have been developed based on recombinant proteins of *Leptospira* for the diagnosis of leptospirosis with similar or higher specificity and sensitivity levels than the microscopic agglutination test. Here, we developed an ELISA system based on recombinant LipL32 protein of *Leptospira* expressed in baculovirus. The LipL32 protein was successfully adapted in an indirect ELISA using dog plasma samples. Optimization of the ELISA resulted in a positive/negative ratio of 7.18 using only 5 ng of rLipL32 per well. Inter-assay and intra-assay variation showed a CV of 3.96% and 6.98%, respectively, suggesting that the ELISA-LipL32 is highly reproducible. When tested with field samples the ELISA-LipL32 detected antibodies in 55/57 (96.5%) plasma samples while a real-time PCR that amplifies a fragment of the LipL32 gene detected 45/57 (78.9%) positive samples. Our results indicate that the ELISA-LipL32 has the potential to be used by veterinarians and public health investigators as a simple, safe, accurate and inexpensive method for the early diagnosis of *Leptospira* infection in dogs. Additional studies are still required for clinical validation on field samples under different epidemiological scenarios.

Key words: Leptospirosis, dogs, ELISA, LipL32

RESUMEN GENERAL

Leptospira infecta una amplia gama de especies animales de compañía, domésticos y silvestres, las cuales excretan las espiroquetas al medio ambiente a través de la orina. Los perros se infectan por contacto directo o indirecto con reservorios de animales silvestres o domésticos infectados aumentando el riesgo de transmisión zoonótica de la enfermedad. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) se considera el estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis, pero tiene baja sensibilidad y es técnicamente compleja. Se han desarrollado distintas pruebas ELISA basados en proteínas recombinantes de *Leptospira* con niveles de especificidad y sensibilidad similares o mejores que MAT. En este trabajo, se desarrolló un sistema ELISA basado en la proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* expresada en baculovirus. LipL32 se adaptó con éxito en un sistema ELISA indirecto utilizando muestras de plasma canino. La optimización del ELISA dio como resultado una relación positivo/negativa de 7.18 empleando solo 5 ng de rLipL32 por pocillo. La variación inter-ensayo e intra-ensayo mostró un CV de 3.96% y 6.98%, respectivamente, sugiriendo que el ELISA-LipL32 es altamente reproducible. En muestras de campo, el ELISA-LipL32 detectó anticuerpos en 55/57 (96.5%) muestras de plasma, mientras que una PCR en tiempo real para LipL32 detectó 45/57 (78.9%) muestras positivas. Los resultados indican que el ELISA-LipL32 tiene potencial para ser utilizado como un método simple, seguro, preciso y de bajo costo para el diagnóstico temprano de leptospirosis en perros. Se requieren estudios adicionales para la validación clínica en muestras de campo bajo diferentes escenarios epidemiológicos.

Palabras clave: Leptospirosis, perros, ELISA, LipL32

CAPÍTULO 1

I INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial debido a su impacto en la salud humana, es causada por bacterias del género *Leptospira*. y se encuentra ampliamente distribuida en México (Sanchez-Montes et al., 2015). Se presume que el principal reservorio de leptospirosis son los roedores, sin embargo, muchos otros mamíferos tanto silvestres como domésticos pueden actuar como reservorio (Picardeau, 2013).

Las leptospirosis tienen una estructura típica de doble membrana donde la membrana citoplasmática y la pared celular de peptidoglicano están estrechamente relacionadas y se superponen por una membrana exterior. Dentro de la membrana externa, el LPS constituye el principal antígeno de *Leptospira* (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Además de LPS, proteínas estructurales y funcionales forman parte de dicha membrana. Estas proteínas son lipoproteínas con relativa abundancia en la superficie celular denominadas: LipL32, LipL21 y LipL41 principalmente (Cullen et al., 2005).

Por otra parte el diagnóstico de leptospirosis se lleva a cabo por diversos medios, el cultivo microbiológico se puede realizar a partir de sangre, orina o tejidos como hígado o riñón, el resultado dependerá de él buen manejo de la muestra y el tiempo, además de otros factores como autólisis de tejidos, pH en el caso de la orina, y el número de bacterias presentes en la muestra (OIE., 2008). Varios protocolos de PCR para la detección de ADN de *Leptospira* en material clínico también han sido desarrollados incluyendo algunos que son específicos para leptospirosis patógenas, sin embargo estos son generalmente realizados solo por laboratorios de diagnóstico o de referencia (OIE., 2008).

También se ha desarrollado una prueba basada en PCR para el diagnóstico rápido y fiable de *Leptospira* en las muestras de orina de la especie bovina, que mostraron 100 % de sensibilidad y especificidad del 99% en comparación con la prueba de cultivo microbiológico (Hernández et al., 2011).

Entre las principales proteínas reconocidas por el sistema inmunológico LipL32 es una proteína expresada en gran cantidad en la membrana de la bacteria, reconocida como un antígeno inmunodominante en la infección por leptospira y por ello altamente reconocida durante la respuesta inmune humoral (Hauk P. et al., 2008). El alto grado de identidad de secuencia LipL32 indica que las estrategias de serodiagnóstico basadas en este antígeno serían eficaces independientemente de la serovariedad infectante. La antigenicidad de LipL32 es reforzada por su alto nivel de expresión en leptospiras patógenas, siendo la proteína de mayor expresión de la bacteria y exclusiva de las especies patógenas (Haake D. y Zuckert., 2016). Como el caso de el gen LipL32 de especies patógenas de *Leptospira spp.* Utilizado por Stoddard y colaboradores en 2009 para una prueba de PCR, codifica para una lipoproteína de membrana externa que se considera un factor de virulencia que no está presente en las especies no patogénicas, ellos desarrollaron y evaluaron un ensayo de PCR en tiempo real utilizando este gen, en el que se utilizaron cebadores y una sonda TaqMan que sólo detecta el ADN de especies patógenas de *Leptospira spp.*, en este, y fue capaz de detectar todas las especies de *Leptospira* patógenas probadas y ninguna de las intermedias ni saprofitas.

Con base en lo anterior, se propone la identificación de leptospiras patógenas a partir de una plataforma de la proteína recombinante en baculovirus LipL32 para la detección de leptospiras patógenas por medio de ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de leptospirosis en animales domésticos.

Hipótesis

Las proteínas de adhesión extracelular de leptospiras son reconocidas por anticuerpos generados como resultado de la infección con leptospiras patógenas y pueden ser utilizadas como plataforma de diagnóstico serológico de leptospirosis en animales domésticos.

II ANTECEDENTES

1. Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por las especies patógenas de las bacterias que pertenecen al género leptospira (Raja V. y Natarajaseenivasan K., 2015). Recientemente reconocida como la zoonosis reemergente más común en el mundo (Mythri B.A., 2016). Debido a que la incidencia de la enfermedad en países tanto en desarrollo como no desarrollados va en aumento y el potencial epidémico que representa, leptospirosis es actualmente reconocida como un importante problema de salud pública a nivel mundial, aunado a esto y por la gran variedad de síntomas que comparte con otras enfermedades infecciosas, leptospirosis es comúnmente sub reportada (WHO., 2018, Vijayachari et al., 2008). Fue descrita por primera vez hace casi 100 años por Adolf Weil, aunque también identificada en Europa y Japón, casi simultáneamente, se creía de naturaleza infecciosa y desde ese tiempo se estableció la relación de la infección con ciertas ocupaciones donde se tenía contacto con agua (Adler, 2015).

Las leptospirosis pueden sobrevivir en el ambiente por periodos prolongados de tiempo o encontrarse en una amplia variedad de especies animales a los que utilizan como huéspedes. El ciclo de la enfermedad incluye tanto animales silvestres como domésticos asimismo es encontrada en todo el mundo con excepción de Antártica. Las bacterias son excretadas en orina de los animales infectados contaminando así el medio ambiente y continuando el ciclo (Vijayachari et al., 2008, Adler, 2015). Los roedores son considerados el principal reservorio para leptospirosis (Picardeau, 2013).

Leptospirosis sigue siendo un problema mayor de salud pública en muchos países, se espera que en los próximos años se vuelva aún más importante debido a la rápida urbanización y el cambio climático (Picardeau, 2013).

1.1 Etiología

El agente etiológico de la leptospirosis es un grupo de bacterias que pertenecen al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*. Dentro del género existen dos tipos de especies, aquellas patogénicas y las que no lo son llamadas saprofitas (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010, Vieira et al., 2014). Su genoma es de entre 3.9 – 4.6 Mbp, distribuido en dos cromosomas circulares una grande y uno pequeño (Picardeau., 2015).

Leptospira spp. Exhibe una arquitectura de superficie la cual asemeja bacterias gram negativas, esto se debe a que posee una de doble membrana. Son largas, delgadas y motiles, de aproximadamente 0.1 μm de diámetro por 6 – 20 μm de largo, con amplitud de hélice de 0.1 - 0.15 μm (Cameron, 2015, Mythri B.A. 2016). Presentan forma de espiral con extremos en forma de gancho (Figura 1), poseen dos endoflagelos insertados en el espacio periplásmico los cuales son los responsables del movimiento en espiral de la bacteria (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010, Cameron, 2015)



Figura 1. Fotomicrografo de *Leptospira Spp.* (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

En la membrana externa de la bacteria se encuentra el lipopolisacárido (LPS) el cual es el principal antígeno de leptospira, tiene alta homología con el LPS de

otras bacterias Gram negativas, sin embargo, no presenta la toxicidad elevada que otros LPS exhiben (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

Además del LPS, la membrana exhibe una serie de proteínas también conocidas como proteínas de membrana las cuales constituyen aproximadamente la mitad de la masa de la membrana externa de la bacteria y participan en los mecanismos de virulencia, adhesión, estructura, inmunidad e importación de nutrientes, entre otros (Raja V. y Natarajaseenivasan K., 2015).

Las interacciones huésped patógeno se llevan cabo en la membrana externa de la bacteria y las moléculas asociadas a esta, principalmente las proteínas de membrana que se encuentran expuestas en la superficie las cuales son reconocidas junto con otras estructuras por el sistema inmunológico (Figura 2) (Cullen et al., 2005, Pinne et al., 2012). Además de tener funciones importantes como virulencia, estructurales, e interacción con el medio ambiente (Nascimento E. et al., 2018).

De dichas proteínas, la proteína LipL 32 es de gran interés debido a que presenta hasta 38 000 copias por célula, esto la convierte en la proteína más abundante de *Leptospira spp.*, constituyendo el 75% del proteoma total de la bacteria, y es considerada la proteína de membrana más importante expresada durante la infección renal (Daher E. et al., 2010, Picardeau, 2015, Raja V. y Natarajaseenivasan K., 2015). Ha sido identificada en todas las leptospirosis patógenas, y clasificada como una proteína altamente inmunogénica (Murray G. et al., 2009). Aunque algunas de sus funciones continúan sin precisar, otras ya han sido detectadas en diversos estudios, las principales funciones que se le atribuyen a la proteína LipL32 son las siguientes: Funciona como adhesina al unirse a la matriz extracelular (colágeno, laminina y fibronectina), también presenta diversos factores asociados a hemólisis (Murray G. et al., 2009).

de su ADN se vuelve más popular para su uso, y aunque la clasificación fenotípica siga utilizándose con fines epidemiológicos, la existencia de ambas clasificaciones y la falta de relación entre ellas cree confusión (Andre-Fontaine, 2006).

Dentro de esta clasificación que se basa en la relación ADN o también conocida como clasificación genómica se separan en 3 grupos de la siguiente manera, seis especies saprofitas, nueve especies patogénicas y cinco intermedias (Picardeau, 2013). Recientemente se agregaron dos nuevas especies a la clasificación, la primera *Leptospira mayottensis* sp. Fue agregada en el grupo de las patógenas alrededor del 2014 y *Leptospira idonii* en las saprofitas en 2013 (Cuadro 1) (Picardeau, M., 2013, Pascale Bourhy et al., 2014., Mitsumasa Saito et al., 2013).

Cuadro 1. Clasificación de Leptospiras.

Patogénicas	Intermedias	Saprofitas
<i>L. interrogans</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. weilii</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. santarosai</i>		<i>L. yanagawae</i>
<i>L. alexanderi</i>		
<i>L. alstonii</i>		<i>L. indonii(2013)</i>
<i>L. kmetyi</i>		
<i>L.mayottensis(2014)</i>		

Clasificación Leptospiras. (Adaptado: Picardeau, M., 2013, Pascale Bourhy et al., 2014., Mitsumasa Saito et al., 2013).

1.3 Fisiopatología

La transmisión puede ser por contacto directo con orina, sangre, tejidos de animales infectados o indirectamente a través de abrasiones en piel o mucosa en contacto con el ambiente contaminado con leptospiras, suelo, agua, alimentos, etc. (Daher E. et al., 2010, Haake and Levett, 2015). (Figura 3).

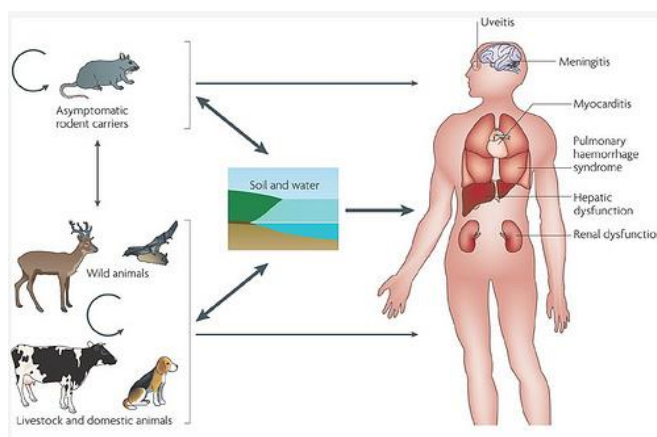


Fig. 3. Transmisión de Leptospirosis. (Reproducido de (Ko et al., 2009)).

Las bacterias ingresan al organismo por vía cutánea, mucosa, conjuntiva, por inhalación de aerosol entre otras (Mythri B.A 2016), se diseminan vía hematológica donde se multiplican, hasta alcanzar tejidos como hígado, riñones y bazo, sistema nervioso central, ojos, tracto genital donde siguen multiplicándose (Andre Fontaine., 2006, Haake and Levett., 2015). Son eliminadas del organismo por el sistema inmunológico del huésped casi por completo, sin embargo, persisten en lugares considerados inmunoprivilegiados como la cámara anterior del ojo y túbulo proximal riñón (Luna et al., 2008, Monahan et al., 2009, Mythri B., 2016).

Existe un gran déficit en información sobre los sistemas de interacción molecular, así como celular, el comportamiento de la enfermedad, entre otras cosas

que permanecen sin precisar (Murray et al., 2009, Marinho M. and Cardoso T.C. 2014).

El curso que sigue la enfermedad es en dos fases, la primera la cual tiene una duración aproximada de entre 3-7 días, es común encontrar la bacteria en sangre es la fase conocida también como septicémica o inicial y posteriormente la segunda fase que se conoce como la fase inmune que puede tener duración hasta de aproximadamente 30 días (Figura 4) (Daher E. et al., 2010, Chalayon et al., 2011).

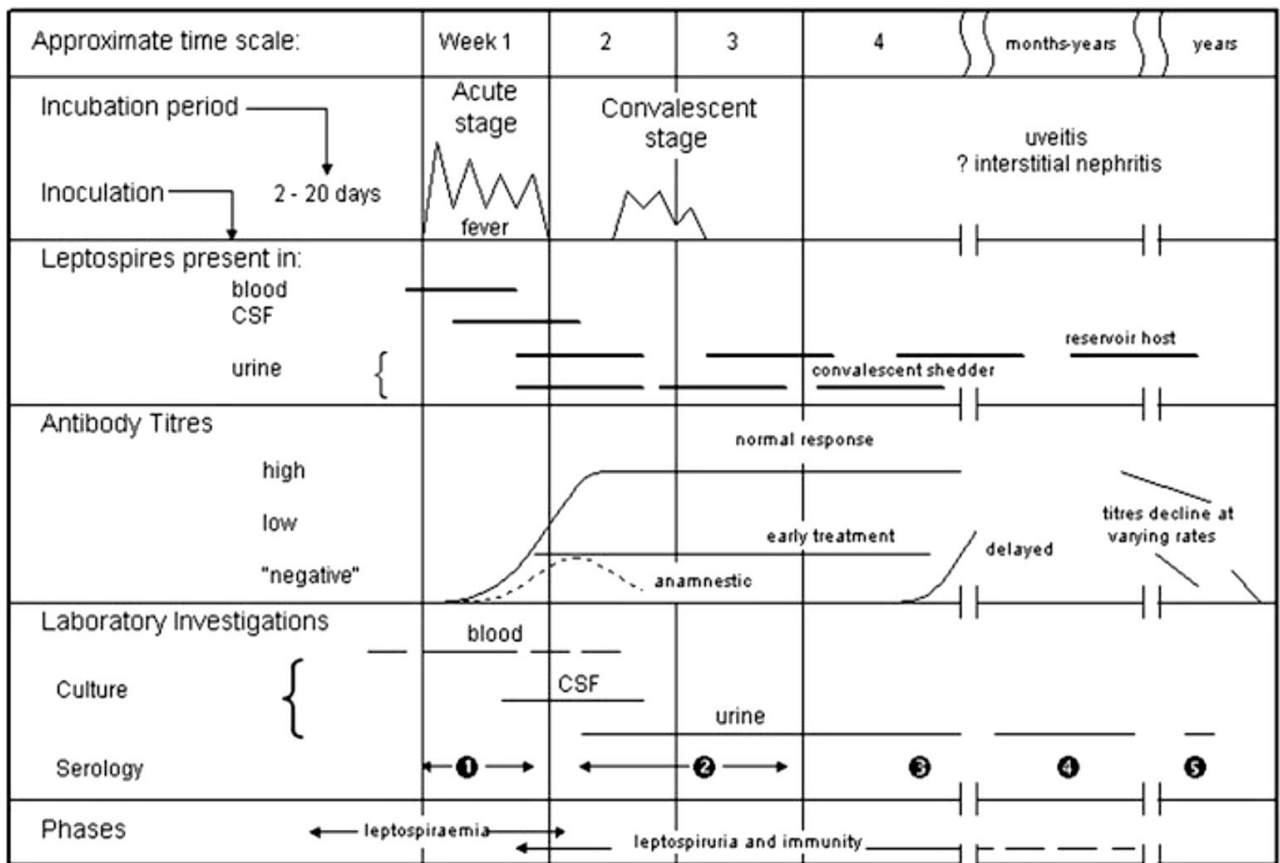


Fig. 4 (Fases de la enfermedad y diagnóstico adaptado de Haake and Levett., 2015).

Las bacterias *leptospira* crean un ambiente propicio para su supervivencia, para lo cual presentan un comportamiento en donde se crea una unión o conglomerado de las colonias de *leptospira* con una matriz protectora a su alrededor a la cual se le conoce como Biofilm, y que tiene la función de proteger a las bacterias del medioambiente hostil, ya sea dentro o fuera del huésped, dicho comportamiento se encuentra en mayor o menor medida dependiendo de las cepas de leptospirosis determinando así su supervivencia en el ambiente o huésped (Monahan A.M. et al., 2009). Se sabe que *Leptospiras spp.* es capaz de sobrevivir semanas o meses en agua o lodo o en ambientes hídricos (Ko et al., 2009).

Otro mecanismo en este caso de defensa que presenta la bacteria es la unión al factor H del complemento con lo cual logran desactivar la respuesta inmunológica montada en su contra (Monahan A.M. et al., 2009).

1.4 Signos clínicos

Es una enfermedad difícil de diagnosticar únicamente observando los signos clínicos debido a que estos se asemejan a una amplia variedad de enfermedades (Damborg P. et al., 2016), en algunos casos inclusive pueden pasar desapercibidos, lo que generalmente se le atribuye a la aparente adaptación de ciertas serovariedades a sus huéspedes, comúnmente en estos huéspedes conocidos como huéspedes de mantenimiento la bacteria logra evadir al sistema inmune, sin embargo en aquellos huéspedes donde la serovariedad no está adaptada, la bacteria provoca una amplia variedad de daños así como los síntomas asociados a los mismos (Monahan A.M. et al., 2009, Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

El desarrollo de la enfermedad y sus síntomas están en función de la virulencia del organismo que esté afectando al huésped, la edad del paciente, así como la inmunidad de este, y el órgano que este afectado (Luna et al., 2008, Mythri B.A 2016).

El período de incubación de la enfermedad es de aproximadamente de 2 a 30 días, aunque la enfermedad no se produce hasta entre una o dos semanas después de la exposición (Ko et al., 2009). Los signos asociados a leptospirosis son variables, algunos como fiebre, mialgias, diarrea, náuseas, vómito, oliguria-anuria, meningitis, hemorragias, dolor articular, son los de mayor frecuencia, sin embargo la amplia variedad de signos clínicos asemeja muchas otras enfermedades, por ello la problemática del diagnóstico correcto y oportuno de leptospirosis (Oliveira et al., 2011, Hartskeerl et al., 2011).

En el caso de los animales, fiebre, diarrea, ictericia, vómitos, hemorragias, fallo renal, pérdidas reproductivas, bajas en la producción, entre otros (Ko et al., 2009, Adler y de la Peña., 2010). Y en los humanos los síntomas se asemejan a los de dengue, malaria o influenza (Stoddard et al., 2009, Haake and Levett, 2015).

1.5 Epidemiología

Se presume que el principal reservorio de leptospiras son los roedores, sin embargo, muchos otros mamíferos tanto silvestres como domésticos pueden actuar como reservorio (Picardeau, 2013).

Hartskeerl y colaboradores en 2011 mencionan que la incidencia de la enfermedad aumenta debido el efecto a nivel mundial del cambio climático el cual es causado por la desestabilización de los sistemas naturales.

Varios estudios mencionan que entre 500,000 a 1, 000,000 casos de leptospirosis ocurren cada año alrededor del mundo (Abela-Ridder et al., 2010, Adler et al., 2011, Costa et al., 2015). Dellagostin y colaboradores en 2017 menciona que en 1999 se estimaban 500 000 casos y el aumento que se observó en 2015 donde llegó a más de un millón de casos y 60 000 muertes por la enfermedad. Pal M. y Hadush A. en 2017 reportan un estimado global de 1.03 millones de casos y casi 60 000 muertes. Por otra parte, las incidencias varían según las zonas geográficas entre otras cosas, además de que se encuentran sub registrada en

lugares donde la vigilancia epidemiológica no es aplicada o es deficiente o puede deberse entre otros factores a la dificultad en el diagnóstico (Lehmann J. et al., 2014).

Entre los factores de riesgo más importantes asociados a la enfermedad se encuentran el contacto con tejidos, orina o fluidos de animales infectados y la exposición ocupacional o recreativa a aguas contaminadas (Vijayachari et al., 2008).

1.6 Diagnóstico

Los dos factores de mayor importancia en cuanto al resultado de la infección por leptospirosis son el diagnóstico oportuno y la apropiada aplicación de un tratamiento adecuado (Ooteman et al., 2006, Daher E. et al., 2010). Los problemas más comunes que se encuentran al realizar el diagnóstico de leptospirosis están generalmente asociados a que los síntomas de la enfermedad son compartidos con una amplia variedad de enfermedades infecciosas, además de que existe una necesidad muy fuerte de tener acceso a pruebas diagnósticas que tengan una mejor sensibilidad que las pruebas que se encuentran actualmente disponibles (Damborg P. et al., 2016). Existen diferentes herramientas para el diagnóstico de leptospirosis, la enfermedad se puede diagnosticar por medio de la detección del organismo o sus componentes, el aislamiento o la detección de anticuerpos contra la enfermedad (Haake y Levett., 2015).

El aislamiento o cultivo y la prueba de macroaglutinación en placa (MAT) son la prueba de referencia para la enfermedad, son muy complicados de llevar a cabo y toman periodos largos de tiempo para llegar a un diagnóstico, además de necesitar instalaciones apropiadas y medidas de seguridad estrictas (Picardeau et al., 2014).

El diagnóstico serológico es el principalmente utilizado para esta enfermedad, el método más aceptado y utilizado como prueba de referencia para la enfermedad es la prueba de Micro aglutinación (MAT) que se basa en la detección de anticuerpos contra leptospira (Chalayon P. et al., 2011). Otra herramienta serológica utilizada comúnmente es la prueba de ELISA (OIE., 2014), la cual también era utilizada con preparaciones de células completas para su uso como alternativa al MAT como prueba de cribado, actualmente los sistemas de ELISA basados en proteínas recombinantes son procedimientos muy útiles en cuanto a la evaluación de grandes tamaños de muestras además de ser más específicos aquellos de células completas (Sohini D. et al., 2004). Sin embargo, ninguna prueba serológica hasta la fecha es altamente confiable (Damborg P. et al., 2016).

El diagnóstico molecular se logra por medio de la prueba de PCR el cual es mucho más sensible que las pruebas de rutina además de establecer un diagnóstico más rápido (Picardeau et al., 2014). Se basa en la detección de la presencia de DNA de *Leptospira spp.* en la muestra, este último método además de ser sensible alguna de sus presentaciones permite diferenciar entre leptospiras patógenas de aquellas no patógenas con el uso secuencias del antígeno específicas (Bharti et al., 2003).

Aunque existe una gran variedad de método de diagnóstico para la enfermedad, cada situación debe ser evaluada por separado para determinar cuál es la mejor opción por utilizar de acuerdo con el escenario.

Existen una gran cantidad de situaciones por las cuales no se llega al diagnóstico certero de la enfermedad, entre las que conciernen a las herramientas de diagnóstico disponibles de cualquier tipo, son principalmente costo, necesidad de infraestructura para realizarlas, disponibilidad de estas en lugares donde la enfermedad es endémica, entre otras. Aunado a esto uno de los principales problemas con el diagnóstico de esta enfermedad es que la respuesta de anticuerpos solo es detectable días o semanas después de la aparición de la enfermedad y si el huésped presenta la infección crónica hay una baja de anticuerpos a niveles casi indetectables (OIE., 2014), por ello la importancia de

establecer los mecanismos de acción de la enfermedad para saber entre otras cosas que prueba es conveniente aplicar de acuerdo al tiempo de infección.

Por lo tanto la necesidad de desarrollar mejores pruebas diagnósticas hoy en día se vuelve más importante debido entre otras cosas a la naturaleza de la enfermedad (Guerreiro et al., 2001) y a que en la actualidad ninguna prueba diagnóstica es completamente satisfactoria (Picardeau., 2013).

1.6 Prevención y Control

El tratamiento debe ser implementado tan pronto el diagnóstico sea presuntivo a leptospirosis y los factores de riesgo o la historia clínica implique una sospecha de contagio ocupacional o recreativo (Haake and Levett., 2015). En algunos casos la enfermedad se resuelve espontáneamente (Barthi et al., 2003). Existen varias alternativas en cuanto a tratamiento de la enfermedad, las bacterias *Leptospiras* son susceptibles a una gama muy amplia de antibióticos. Por ello se instauran diferentes tipos de tratamiento según el caso, si es agudo si es crónico, en fase inicial o grave y dependiendo de estos factores se suele utilizar comúnmente antibióticos como, doxiciclina la cual también está recomendada para su uso profiláctico cuando se sospecha que se adquirió la enfermedad o que se pudo estar en contacto según la historia clínica , también se utilizan penicilina, eritromicina, amoxicilina, entre los más importantes y en casos severos en humanos se utiliza terapia de mantenimiento e inclusive diálisis (Haake and Levett., 2015, Mythri B. 2016).

Las estrategias de prevención se encaminan a producir conciencia de la enfermedad sus mecanismos de transmisión, su epidemiología y la vacunación (Haake y Levett., 2015), va a depender en gran medida de las prácticas de higiene ocupacional así como personal, control de roedores u otro tipo de fauna nociva en explotaciones pecuarias, uso de protección en personas que estén involucradas ya sea por su ocupación tanto como por viajes o actividades al aire libre, y

principalmente el conocimiento de la enfermedad y como evitarla se consideran clave en los programas de control y erradicación (Mythri B.,2016).

En cuanto a vacunación están disponibles comercialmente para su uso en ganado bovino, perros y cerdos, vacunas generalmente compuestas de células completas de leptospiras o lipopolisacáridos conocidas como bacterinas, que generalmente son específicas para serogrupo y no protegen contra las cepas que no estén incluidas en la formula (OIE., 2014, Adler., 2015). Las vacunas en humanos han sido reportadas en lugares como Cuba, Rusia, China, donde se han hecho diversos estudios y están disponibles (Barthi et al., 2003, Adler., 2015). En general la duración de la inmunidad es relativamente corta es por lo que la vacunación anual se recomienda en la mayoría de los casos. Ninguna vacuna viva está disponible en la actualidad, y se está estudiando la posibilidad de usar vacunas recombinantes debido a que está disponible actualmente la tecnología para utilizar DNA y la disponibilidad de las secuencias de los genomas de *Leptospira spp.* (Adler., 2015).

Las vacunas protegen al animal contra los síntomas, sin embargo no previenen la infección, aunque este parece ser el método más eficiente en el control de la enfermedad en caninos (Andre-Fontaine, 2006). Con la estimación más certera de la enfermedad en la actualidad es posible evaluar estrategias de control con un enfoque en una sola salud (Costa et al., 2015).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y área de estudio

El desarrollo y la estandarización de ELISA-rLipL32 se realizaron en la ciudad de Mexicali en el Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias (IICV), de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en el noroeste de México.

Diseño del estudio

Se incluyeron en este trabajo un total de 57 muestras de plasma y orina de un estudio anteriormente realizado (sin publicar) tomadas de perros callejeros capturados por el Centro municipal de Control Animal de Mexicali (CEMCA) en 2015. De ese grupo de muestras, 45 dieron positivo en la prueba diagnóstica de PCR en tiempo real (rtPCR-LipL32) de *Leptospira* LipL32 realizada en muestras de orina. Se analizaron muestras de plasma correspondientes a las 45 muestras de orina rtPCR-LipL32 positivas y 12 negativas para detectar anticuerpos contra la leptospira. Utilizando el ELISA-rLipL32 y los resultados de ambas pruebas comparadas. Se usó un valor de corte positivo con una OD ≥ 0.750 para comparar los resultados de ambas pruebas. Ese valor de corte corresponde al 50% del valor de OD medio de las muestras de control positivo resultante para la optimización del ELISA-LipL32.

Los controles positivos fueron obtenidos de los seis sueros caninos positivos a leptospirosis por medio de la prueba de RT-PCR con las más elevadas longitudes de onda y realizando un pool de dichas muestras, para el control negativo se utilizó suero fetal bovino (SFB).

Diseño de la proteína LipL32 recombinante (rLipL32)

El diseño de la proteína rLipL32 se basó en la secuencia del gen LipL32 de la cepa 200901482 de *Leptospira interrogans* (número de acceso de GenBank JN683904.1), un gen de 474 pares de bases (bp) que codifica una proteína de 158 aminoácidos (número de acceso de GenBank AEZ53279) .1).

Desarrollo y producción de antígenos recombinantes de LipL32.

La expresión y síntesis de rLipL32 se realizó por GenScript (Piscataway, NJ, EE. UU.) Utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Brevemente, la secuencia original JN683904.1 fue codon optimizada y se añadió una etiqueta 8-His en el terminal amino de la molécula de ADN. La secuencia de ADN objetivo optimizada de LipL32 se sintetizó y se subclonó en el vector pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) Para la expresión de células de insecto. Se usaron células competentes DH10Bac de Max Efficiency para la generación de ADN de bacmid recombinante y se transfectaron en cultivo de células de insecto Sf9. Los cultivos de células Sf9 se incubaron en medio de cultivo de células de insectos libres de proteínas y sin suero Sf-900 II durante 5 a 7 días a 27 ° C. Los cultivos celulares se recogieron y se centrifugaron y el sobrenadante recogido se designó como el stock viral P1. Se produjo una reserva viral amplificada en P2 para la infección. Para la expresión de rLipL32, la reserva viral amplificada en P2 se optimizó para la infección de cultivos de células Sf9 a 0,5, 3 y 5 restos de infección (MOI) y se recogió a las 48, 72 y 96 horas después de la infección. Los sedimentos celulares se recogieron y se lisaron utilizando un tampón de lisis celular adecuado. Los lisados celulares se incubaron con columnas de Ni-NTA para capturar la proteína diana rLipL32. Las fracciones eluidas se agruparon, se dializaron y se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot usando protocolos estándar para las mediciones de peso molecular y pureza. El anticuerpo primario para la transferencia Western fue un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante anti-His (HRP) de ratón. La

concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. GenScript produjo y entregó un lote de 3,6 mg de rLipL32 con una concentración de 0,20 mg / ml y una pureza del 80% estimada mediante análisis de densitometría de la SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie.

Procedimiento RT-PCR

Se utilizaron los resultados a la prueba de RT-PCR de una serie de muestras del banco de sueros del ULADI-IICV de un estudio anterior realizado por miembros del CADE en el IICV (Data unpublished- sin publicar). En el cuadro 2 se indica los reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción.

Cuadro 2. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de *Leptospira*

Reactivo	400nM/ Reacción
<i>Master Mix</i>	5 µl
<i>DNA template</i>	1 µl
<i>Primer 1- Forward</i>	0.5 µl
<i>Primer 1- reverse</i>	0.5 µl
<i>H2O</i>	3 µl
<i>Volumen final</i>	10 l

Desarrollo del sistema ELISA indirecto rLipL32 para leptospirosis

La proteína rLipL32 se estandarizó para su uso como antígeno en fase sólida para la detección de anticuerpos en un sistema ELISA indirecto. La concentración óptima de antígeno de la proteína rLipL32, las muestras de suero y las diluciones de anticuerpos conjugados con enzimas, se determinaron a través de procedimientos estándar de titulación de tablero de ajedrez (Naslund et al 2014).

Brevemente, el antígeno de la proteína rLipL32 se diluyó en tampón bicarbonato de carbonato a pH 9.6 a una concentración de 200, 100, 50, 25, 10 y 5 ng por pocillo. Después de la incubación durante la noche a 4°C, las placas estaban listas para usar. Para realizar las pruebas, las placas se lavaron 5 veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7.5 que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST). Los controles positivos y negativos se diluyeron 2 veces de 1:25 a 1: 200 y se agregaron por duplicado a los pocillos apropiados. Después de la incubación a 37 ° C durante 1 hora, las placas se lavaron como se describió anteriormente y 100 µL de conjugado anti-IgG HRP de perro diluido 1: 5,000, 1: 10,000, 1: 20,000 1: 40,000 y 1: 80,000 en PBTS agregados al individuo platos. Después de otra ronda de incubación y lavado, se agregaron 100 µL de solución de sustrato (TMBS) (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se detuvo el desarrollo de color con 30 µL por pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,16 M después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los valores de densidad óptica (OD) se obtuvieron a 450 nm utilizando un lector ELISA automatizado. Los criterios de selección para el mejor rendimiento del sistema rLipL32 ELISA se determinaron en función de la cantidad de antígeno por pocillo, la dilución del suero y la dilución del conjugado enzimático que dio lugar a la máxima amplitud de diferencia entre el valor medio de OD del suero de control positivo. sobre el valor medio de OD del suero de control negativo, expresado como la relación positiva / negativo (relación P / N).

Precisión del ELISA-rLipL32

Se probaron ocho alícuotas de los sueros de control positivo agrupados y 8 alícuotas de los sueros de control negativo agrupados a *Leptospira* de los experimentos de estandarización de ELISA-LipL32 en posiciones aleatorias en los 96 pocillos de las placas de microtitulación durante 5 días no consecutivos. A partir de los resultados, se calculó la OD media, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para obtener la repetibilidad de las muestras de suero analizadas en la misma placa (variación intra-ensayo) y en diferentes placas en diferentes momentos (inter-ensayo). Se consideró que un valor de CV inferior al 20% produce una variación aceptable (Andreasson et al., 2015).

Rango dinámico y linealidad del ELISA-LipL32

El límite superior e inferior de detección y la linealidad de dilución se calcularon para establecer el rango de trabajo del ELISA-LipL32 que produce un resultado confiable. Se analizaron diluciones en serie de dos veces de los sueros de control positivo agrupados desde la dilución 1:25 (dilución de trabajo) hasta 1: 6.400. Un conjunto de los sueros de control negativo agrupados a *Leptospira* diluido 1:25 y un conjunto de blancos de PBST se incluyeron en la prueba. Todas las muestras positivas, negativas y en blanco se procesaron en octuplicados en una placa de microtitulación. ELISA-rLipL32 con muestras de campo.

Estandarización ELISA indirecto LipL32

Se realizó una titulación en tablero de ajedrez usando la proteína rLipL32 como antígeno de fase sólida (Figura 5); los sueros con más alta densidad óptica a leptospirosis por medio de RT-PCR como controles positivos y suero fetal bovino (SFB) como control negativo. La relación de la absorbancia de sueros positivos sobre sueros negativos se utilizó para determinar las concentraciones de reactivo óptimas para el ELISA.

Plato STD-1: 25 ng de LipL32/pozo													
	Conjugado HRP 1:2500					Conjugado HRP 1:5000					H ₂ O		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución sueros
A													A POS 1:25
B													B POS 1:50
C													C POS 1:100
D													D POS 1:200
E													E 1:25 NEG
F													F 1:50 NEG
G													G 1:100 NEG
H													H 1:200 NEG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Fig.5. Formato de tablero empleado para estandarización de reactivos de ELISA rLipL32

De los resultados de RT-PCR se seleccionaron las 6 muestras (9, 10, 21, 23, 29 y 33) que desarrollaron la mayor cantidad de unidades de fluorescencia relativa, y se probaron por medio de iELISA rLipL32 para evaluar el sistema en comparación con RT-PCR LipL32.

Se realizó un pool de las 6 muestras seleccionadas para desarrollar una serie de 24 repeticiones para comprobar la repetibilidad de la prueba utilizándolas como control positivo y suero fetal bovino como control negativo.

Equipo utilizado: PCR tiempo real CFX96 de *BioRad* para el sistema RT-PCR de *Leptospira*, Lector Elisa 96 pozos Eli Read Kontrolab.

Análisis de datos:

El análisis de los datos se realizó utilizando la versión 9.4 de Statistical Analysis Systems (SAS). (SAS Institute, Carolina del Norte, EE.UU.). Se estableció el estadístico Kappa para nivel de concordancia entre las distintas pruebas diagnósticas empleadas en este trabajo (Martin, 1987). además de prueba de hipótesis por medio de regresión lineal simple de las diluciones dobles de los sueros para evaluar si existía o no correlación entre los datos.

RESULTADOS

RT-PCR para muestras de sangre estudio anterior (sin publicar)

Según los resultados del análisis anterior (2015) del cual se tomaron 57 muestras para este estudio. 79 muestras de ADN proveniente de sangre de perros de CEMCA, de los cuales 60 (75.95%) lograron una amplificación por encima de la línea umbral que establece el software CFX96 y por lo tanto fueron consideradas como positivas (cuadro 3) (figura 6).

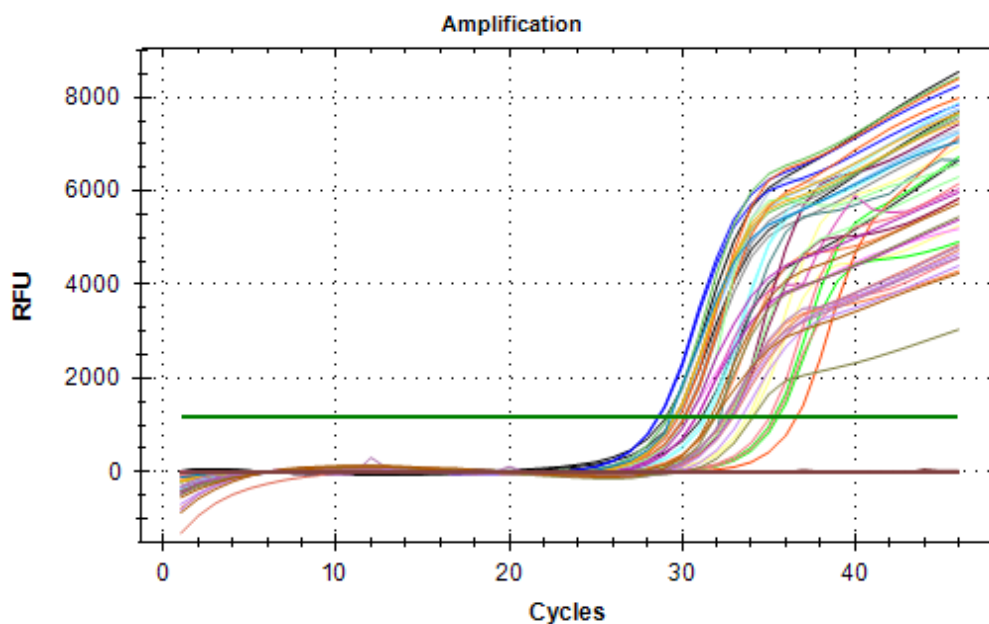


Figura 6. Curva de amplificación de muestras de sangre probadas por el sistema RT-PCR para *Leptospira*.

Cuadro 3. Resultados del RT-PCR para muestras de sangre de perros capturados en el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali 2015

MUESTRA	POSITIVO	NEGATIVO
N:79	60 (75.95%)	19 (24.05%)

Las seis muestras seleccionadas de RT-PCR (9, 10, 21, 23, 29 y 33) que desarrollaron la mayor cantidad de unidades de fluorescencia relativa todos obtuvieron valores de densidad óptica mayores de 1 (Figura 7), con las cuales se realizó un pool de las muestras para utilizarse como control positivo.

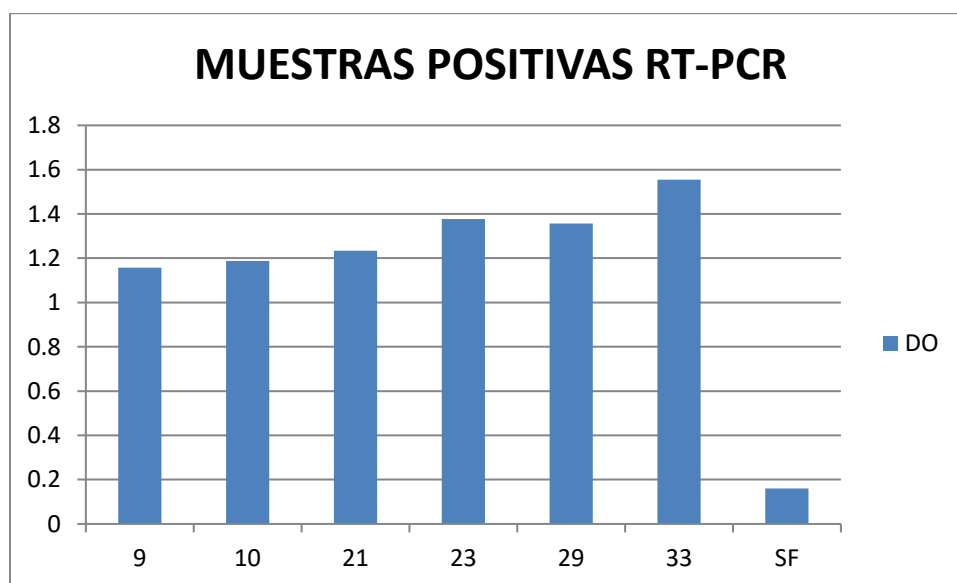


Fig. 7. Muestras positivas a RT-PCR seleccionadas por tener las más altas fluorescencias relativas y probadas por medio de iELISA rLipL32 para utilizarse como control positivo, en contraste con Suero fetal (SF) utilizado como control negativo.

Todas las muestras seleccionadas se comportaron de la manera que se anticipó teniendo valores de densidades ópticas mayores a 1 y el control negativo valores menores a 0.2.

Estandarización del sistema rLipL32

En base a los valores de densidades ópticas, se obtuvo la mejor relación positiva / negativa. El mejor desempeño se logró empleando 5ng/pozo de rLipL32, el suero a una dilución de 1:25 y el conjugado enzimático diluido 1: 50,000 (Cuadro 4).

Sin embargo, varias otras combinaciones y diluciones de reactivos también produjeron relaciones positivas / negativas aceptables para una prueba de ELISA válida (Cuadro 4). El sistema rLipL32 I-ELISA produjo un ruido de fondo mínimo y discrimina claramente entre los controles positivos y negativos utilizados. Además, durante las diferentes ejecuciones del ensayo no hubo variaciones excesivas dentro de las lecturas de absorbancia de los controles positivo y negativo que demostraban una alta repetibilidad del ensayo.

Cuadro 4. Relación Positiva / Negativa, experimentos de estandarización rLipL32

PROTEINA	CONJUGADO	SUERO	P/N
10ng	1:25 000	1:25	5.46
5ng	1:25 000	1:25	5.24
5ng	1:30 000	1:25	5.48
5ng	1:50 000	1:25	7.9
50ng	1:100 000	1:25	3.6

Con respecto al resultado del análisis kappa de concordancia entre RT-PCR y I-ELISA rLipL32 para las 79 muestras analizadas en 2015, se realizó la selección de 57 de las 79 muestras debido a que algunas no tenían suficiente cantidad de suero para utilizarlas en el análisis (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación Resultados RT-PCR con ELISA rLipL32

RT-PCR		ELISA rLipL32	
Positive	Negative	Positive	Negative
45(78%)	12(21%)	57(100%)	0 (0%)

Del pool de muestras que se realizaron las 24 repeticiones positivas y negativas, el comportamiento fue el esperado donde las muestras negativas tuvieron valores menores a 0.25 DO, y las muestras positivas valores mayores a 0.70 DO.

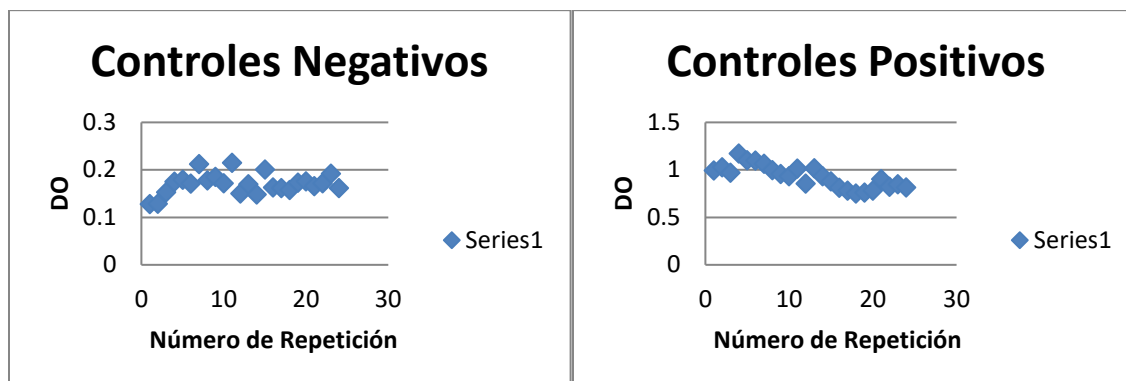


Figura 8. Gráficos comportamiento controles negativos y positivos

Del pool de muestras positivas que se probaron por medio del ELISA Indirecto rLipL32 a diferentes diluciones seriadas dobles (**1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1: 1600, 1: 3200**). Se obtiene un valor de R^2 de 0.8068 (Fig.4).

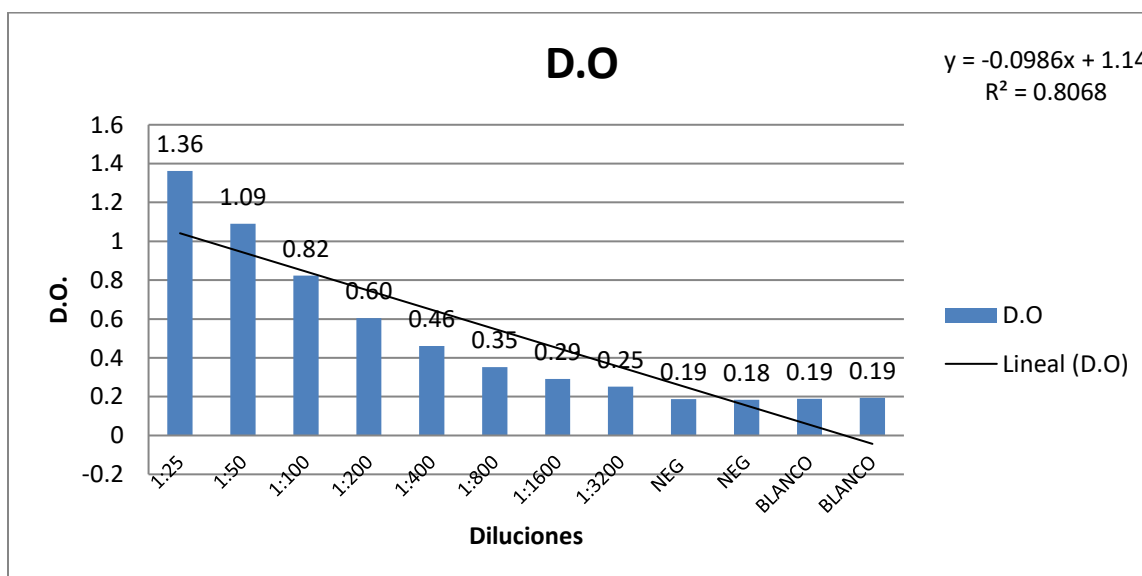


Figura 9. Regresión lineal simple diluciones dobles de sueros.

En cuanto al estadístico kappa para concordancia entre pruebas diagnósticas para evaluar las muestras CONTROL positivas RT-PCR con el sistema iELISA rLipL32 por medio del programa para análisis estadísticos SAS 9.3. Obtuvo un valor de KAPPA de 1 (Figura 10).

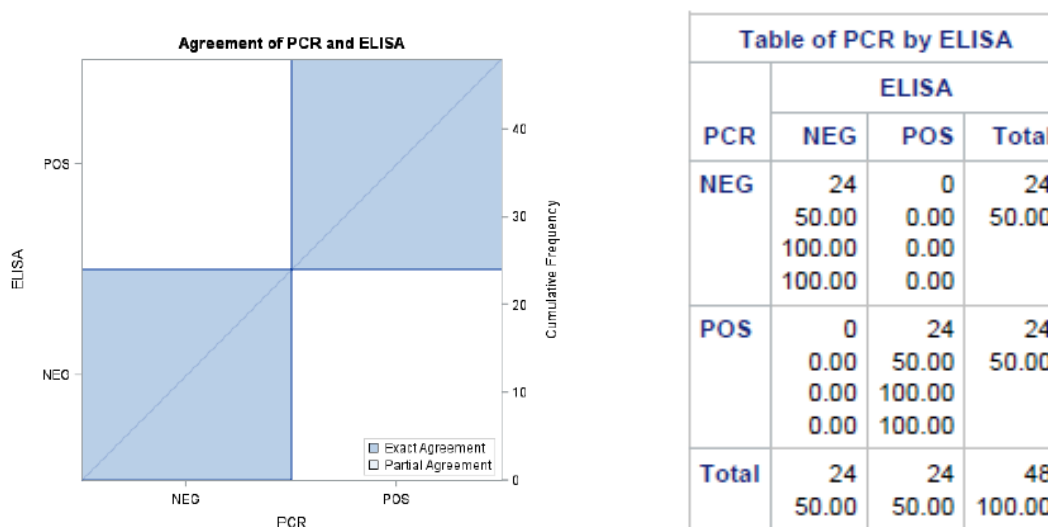


Figura. 10. Análisis Kappa RT-PCR – iELISArLipL32

De las 24 muestras positivas para RT-PCR obtuvimos 24 muestras positivas a iELISA rLipL32, así mismo para las 24 muestras negativas a RT-PCR obtuvimos 24 muestras negativas a iELISA rLipL32. Confirmando así que el sistema iELISA rLipL32 estaba funcionando correctamente en comparación con RT-PCR como referencia.

En cuanto al resultado del análisis kappa para concordancia entre RT-PCR y I-ELISA rLipL32 para las 79 muestras analizadas en 2015, la concordancia fue un valor de kappa de 79 el cual, según los valores de Kappa de Martin, 1987 es de una concordancia considerable o sustancial, se propone continuar con el análisis para explicar dichos resultados.

DISCUSIÓN

Es importante señalar que la mayoría de los sistemas ELISA indirectos disponibles, utilizan células completas de cepas de *Leptospira spp* como antígeno de fase sólida, lo cual proporciona alta sensibilidad para detectar animales positivos a *Leptospira spp*, pero también los hace más vulnerables a producir reacciones serológicas cruzadas falsas positivas con otros microorganismos (Boonyod et al., 2005). En este trabajo, se utilizó un sistema ELISA indirecto que utiliza como antígeno la proteína recombinante rLipL32 la cual se expresa exclusivamente en cepas patógenas de leptospira. Lo anterior, permitió la aplicación de un sistema de detección de anticuerpos dirigidos contra una región antigénica única para bacterias del género leptospira y que se anticipa será capaz de discriminar de animales infectados con otros microorganismos.

Si bien el sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de proteína recombinante rLipL32 utilizado en este estudio se anticipa será capaz de discriminar animales infectados con leptospira de otros microorganismos y establecer un diagnóstico más certero de infección en un período corto de tiempo se recomienda realizar un mayor análisis para la validación del mismo para promover su uso como alternativa a la prueba de MAT.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abela-Ridder, B., Sikkema, R. & Hartskeerl, R.A. (2010). Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents*, Vol. 36 Suppl 1, pp. S5-7.
2. Adler, B. (2015). History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 387, pp. 1-9.
3. Adler, B. & de la Pena Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, Vol. 140, No. 3-4, pp. 287-96.
4. Adler, B., Lo, M., Seemann, T. & Murray, G.L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol*, Vol. 153, No. 1-2, pp. 73-81.
5. Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk van Doorn, L. J. C., Blennow, K., Chiasserini, D., Engelborghs, S., et al. (2015). A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Frontiers in Neurology*, 6(179).
6. Andre-Fontaine, G. (2006). Canine leptospirosis--do we have a problem? *Vet Microbiol*, Vol. 117, No. 1, pp. 19-24.
7. Boonyod D1, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, Chirathaworn C. LipL32, an outer membrane protein of Leptospira, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2005 Jun-Sep;23(2-3):133-41.
8. Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E. & Vinetz, J.M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, Vol. 3, No. 12, pp. 757-71.
9. Cameron, C.E. (2015). Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 387, pp. 21-41.
10. Chalayon, P., Chanket, P., Boonchawalit, T., Chattanadee, S., Srimanote, P. & Kalambaheti, T. (2011). Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 105, No. 5, pp. 289-97.
11. Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B. & Ko, A.I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, Vol. 9, No. 9, pp. e0003898.
12. Cullen, P.A., Haake, D.A. & Adler, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 28, No. 3, pp. 291-318.
13. Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A. & Adler, B. (2005). Surfaceome of Leptospira spp. *Infect Immun*, Vol. 73, No. 8, pp. 4853-63.
14. P.Damborg*E.M.Broens†B.B.Chomel‡S.Guenther§F.Pasmans||J.A.Wagenaar†J.S.Weese¶L.H.Wieler§U.Windahl#D.Vanrompay††L.Guardabassi*, Bacterial Zoonoses Transmitted by Household Pets: State-of-the-Art and Future Perspectives for Targeted Research and Policy Actions, *Journal of*

Comparative Pathology, Volume 155, Issue 1, Supplement 1, July 2016, Pages S27-S40.

15. Daher, Elizabeth De Francesco, Abreu, Krasnalhia Lívia Soares de, & Silva Junior, Geraldo Bezerra da. (2010). Leptospirosis-associated acute kidney injury. *Brazilian Journal of Nephrology*, 32(4), 408-415. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002010000400010>
16. Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galvao Reis, M., Levett, P.N., Ko, A.I. & Haake, D.A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*, Vol. 69, No. 8, pp. 4958-68.
17. Haake, D.A. & Levett, P.N. (2015). Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 387, pp. 65-97.
18. Haake, David A, and Wolfram R Zückert. "The Leptospiral Outer Membrane." *Current topics in microbiology and immunology* 387 (2015): 187–221. PMC. Web. 19 Apr. 2018.
19. Hartskeerl, R.A., Collares-Pereira, M. & Ellis, W.A. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, Vol. 17, No. 4, pp. 494-501.
20. Hauk, P., Macedo, F., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., de Moraes, Z. M., Barbosa, A. S., & Ho, P. L. (2008). In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin . *Infection and Immunity*, 76(6), 2642–2650. <http://doi.org/10.1128/IAI.01639-07>
21. Hernández R.P., Díaza C.A., Dalmaua E.A., Quintero G.M., 2011. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 84, Issue 1, January, Pages 1–7.
22. Ko, A.I., Goarant, C. & Picardeau, M. (2009). Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, Vol. 7, No. 10, pp. 736-47.
23. Lehmann, J.S., Matthias, M.A., Vinetz, J.M. & Fouts, D.E. (2014). Leptospiral pathogenomics. *Pathogens*, Vol. 3, No. 2, pp. 280-308.
24. Levett, P.N. (2015). Systematics of leptospiroaceae. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 387, pp. 11-20.
25. Lo, Y. Y., Hsu, S. H., Ko, Y. C., Hung, C. C., Chang, M. Y., Hsu, H. H., Pan, M. J., Chen, Y. W., Lee, C. H., Tseng, F. G., Sun, Y. J., Yang, C. W., and Pan, R. L. Essential calcium-binding cluster of Leptospira LipL32 protein for inflammatory responses through the Toll-like receptor 2 pathway. *J Biol Chem* 288(17), 12335-44, 2013.
26. Lunaa,d, A.M.A. C.L.P. Molesb , R.D. Gavaldónb , V.C. Navad yG.F. SalazarC. LA LEPTOSPIROSIS CANINA Y SU PROBLEMÁTICA EN MÉXICO. aCENID-Microbiología. INIFAP; bDPyA y DAS, UAM-Xochimilco; cFMZ, UAEM; dClínica privada. 2008.
27. Marinho Márcia* and Tereza Cristina Cardoso, Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues, Marinho and Cardoso J Med Microb Diagn 2014, 4:1 <https://dx.doi.org/10.4172/2161-0703.1000e127>.

28. Mythri B.A. LEPTOSPIROSIS – AN ENIGMATIC ZOONOSIS. Review article. Karnataka Institute of Medical Sciences, KA, India. 2016.
29. Mitsumasa Saito, Sharon Y. A. M. Villanueva, Yoshiaki Kawamura, Ken-ichiro Iida, Junko Tomida, Takaaki Kanemaru, Eri Kohno, Satoshi Miyahara, Akiko Umeda, Kazunobu Amako, Nina G. Gloriani and Shin-ichi Yoshida, *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013), 63, 2457–2462 DOI 10.1099/ijs.0.047233-0.
30. M. Monahan, J. J. Callanan, and J. E. Nally, Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Veterinary Pathology*. Vol 46, Issue 5, pp. 792 – 799. First Published May 9, 2009. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV>
31. Murray, G.L., Srikram, A., Hoke, D.E., Wunder, E.A., Jr., Henry, R., Lo, M., Zhang, K., Sermswan, R.W., Ko, A.I. & Adler, B. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, Vol. 77, No. 3, pp. 952-8.
32. Nascimento Filho Edson G.^aMonica L.Vieira^aAline F.Teixeira^aJademilson C.Santos^aLuis G.V.Fernandes^aFelipe J.Passalia^{ab}Brenda B.Daro^{ab}AmandaRossini^{ab}Leandro T.Kochi^{ab}Maria F.Cavenague^{ab}Daniel C.Pimenta^cAna L.T.O.Nascimento^a. Proteomics as a tool to understand *Leptospira* physiology and virulence: Recent advances, challenges and clinical implications. *Journal of Proteomics*. 2018.
33. Naslund, K., Blomqvist, G., Verneris, C., Zientara, S., Breard, E., & Valarcher, J. F. (2014). Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 71.
34. Dellagostin, Odir A. et al. "Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates." Ed. Christopher Woelk. *International Journal of Molecular Sciences* 18.1 (2017): 158. PMC. Web. 19 Apr. 2018.
35. Oliveira, R., de Moraes, Z.M., Goncalves, A.P., Romero, E.C., Vasconcellos, S.A. & Nascimento, A.L. (2011). Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One*, Vol. 6, No. 7, pp. e21962.
36. Ooteman, M.C., Vago, A.R. & Koury, M.C. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*, Vol. 65, No. 2, pp. 247-57.
37. OIE Terrestrial Manual, CHAPTER 2.1.9. LEPTOSPIROSIS, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf, 2014.
38. OIE Terrestrial Manual, 2008.
39. Pascale Bourhy, Louis Collet, Sylvain Brisse, and Mathieu Picardeau, *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans, *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Dec 1; 64(Pt 12): 4061–4067. doi: 10.1099/ijs.0.066597-0, PMCID: PMC4811635 PMID: 25249563,

40. Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, Vol. 43, No. 1, pp. 1-9.
41. MathieuPicardeau^a EricBertherat^b MichelJancloes^c Andreas N.Skouloudis^d KaraDurski^b Rudy A.Hartskeerl^e. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. Review. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Volume 78, Issue 1, January 2014, Pages 1-8.
42. Pal M, Hadush A (2017) Leptospirosis: An Infectious Emerging Waterborne Zoonosis of Global Significance. *Air Water Borne Dis* 6: 133. doi: 10.4172/2167-7719.1000133
43. Picardeau, M. (2015). Genomics, proteomics, and genetics of leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 387, pp. 43-63.
44. Pinne, M., Matsunaga, J. & Haake, D.A. (2012). Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol*, Vol. 194, No. 22, pp. 6074-87.
45. Raja V¹, Natarajaseenivasan K., Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs), Crit Rev Microbiol. 2015 Feb;41(1):1-17. doi: 10.3109/1040841X.2013.787387. Epub 2013 May 21. (FIG 2)
46. Sánchez-Montes S, Espinosa-Martínez DV, Ríos-Muñoz CA, Berzunza-Cruz M, Becker I (2015) Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and Potential Distribution of Human Cases. *PLoS ONE* 10(7): e0133720. doi: 10.1371/journal.pone.0133720.
47. Socolovschi, C., Angelakis, E., Renvoise, A., Fournier, P. E., Marie, J. L., Davoust, B., Stein, A., and Raoult, D. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis* 15(10), 2011.
48. SohiniDey^a C. MadhanMohan^a T.M.A. SenthilKumar^b P.Ramadass^b A. MahalingaNainar^b K.Nachimuthu^b, Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis, Veterinary Microbiology, Volume 103, Issues 1–2, 5 October 2004, Pages 99-106.
49. Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K. & Hoffmaster, A.R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol. 64, No. 3, pp. 247-55.
50. Torres-Castro M1, Hernández-Betancourt S, Agudelo-Flórez P, Arroyave-Sierra E, Zavala-Castro J, Puerto FI. [Current review of the epidemiology of leptospirosis]. [Article in Spanish; Abstract available in Spanish from the publisher]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016 Sep-Oct;54(5):620-5.
51. Vieira, M.L., Fernandes, L.G., Domingos, R.F., Oliveira, R., Siqueira, G.H., Souza, N.M., Teixeira, A.R., Atzingen, M.V. & Nascimento, A.L. (2014). Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiol Lett*, Vol. 352, No. 2, pp. 129-39.
52. Vijayachari, P., Sugunan, A.P. & Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*, Vol. 33, No. 4, pp. 557-69.
53. WHO., Neglected Zoonotic Diseases, 2018, [://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en/)

CAPÍTULO 3

iii ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

3-1 Development of an indirect ELISA based on baculovirus recombinant LipL32 protein antigen for the accurate and inexpensive diagnosis of canine leptospirosis

Carolina Orozco-Cabrera,^a Gilberto López-Valencia,^a Soila M. Gaxiola-Camacho,^b Nohemí Castro-Del Campo,^b Sergio A. Cueto-González,^a José G. Guerrero-Velázquez,^a Katty Moreno-Torres,^a Kelvin O. Espinoza-Blandón,^a Sergio D. Gómez-Gómez,^a Enrique Trasviña-Muñoz,^a Cinthya Torres-Guzmán,^a and Francisco J. Monge-Navarro,^{a,*}

^a Academic Group for Disease Diagnosis, Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico Address: Km. 3.5 Carretera a San Felipe, Fraccionamiento Campestre, Mexicali, Baja California, México, CP 21386, México.

^b Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Autonomous University of Sinaloa, Blvd. San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito, Predio Las Coloradas, Culiacán, Sinaloa, México, CP 80246.

* Corresponding Author: Dr. Francisco J. Monge Navarro. E-mail: fmonge@uabc.edu.mx
Address: Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico. Address: Km. 3.5 Carretera a San Felipe, Fraccionamiento Campestre, Mexicali, Baja California, México, CP 21386, México.
Telephone: +526862620607, Fax: +526865636907.

ABSTRACT

Leptospira infects a wide range of companion, domestic, and wild animal species, shedding the spirochetes into the environment via urine. Dogs become infected by direct or indirect contact with wild or domestic infected animal reservoirs increasing the risk of zoonotic transmission of the disease. The microscopic agglutination test has been used as the gold standard for the diagnosis of leptospirosis but has low sensitivity and is technically complex. Several ELISAs have been developed based on recombinant proteins of *Leptospira* for the diagnosis of leptospirosis with similar or higher specificity and sensitivity levels than the microscopic agglutination test. Here, we developed an ELISA system based on recombinant LipL32 protein of *Leptospira* expressed in baculovirus. The LipL32 protein was successfully adapted in an indirect ELISA using dog plasma samples. Optimization of the ELISA resulted in a positive/negative ratio of 7.18 using only 5 ng of rLipL32 per well. Inter-assay and intra-assay variation showed a CV of 3.96% and 6.98%, respectively, suggesting that the ELISA-LipL32 is highly reproducible. When tested with field samples the ELISA-LipL32 detected antibodies in 55/57 (96.5%) plasma samples while a real-time PCR that amplifies a fragment of the LipL32 gene detected 45/57 (78.9%) positive samples. Our results indicate that the ELISA-LipL32 has the potential to be used by veterinarians and public health investigators as a simple, safe, accurate and inexpensive method for the early diagnosis of *Leptospira* infection in dogs. Additional studies are still required for clinical validation on field samples under different epidemiological scenarios.

Key words: Leptospirosis, dogs, ELISA, LipL32

RESUMEN

Leptospira infecta una amplia gama de especies animales de compañía, domésticos y silvestres, las cuales excretan las espiroquetas al medio ambiente a través de la orina. Los perros se infectan por contacto directo o indirecto con reservorios de animales silvestres o domésticos infectados aumentando el riesgo de transmisión zoonótica de la enfermedad. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) se considera el estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis, pero tiene baja sensibilidad y es técnicamente compleja. Se han desarrollado distintas pruebas ELISA basados en proteínas recombinantes de *Leptospira* con niveles de especificidad y sensibilidad similares o mejores que MAT. En este trabajo, se desarrolló un sistema ELISA basado en la proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* expresada en baculovirus. LipL32 se adaptó con éxito en un sistema ELISA indirecto utilizando muestras de plasma canino. La optimización del ELISA dio como resultado una relación positivo/negativa de 7.18 empleando solo 5 ng de rLipL32 por pocillo. La variación inter-ensayo e intra-ensayo mostró un CV de 3.96% y 6.98%, respectivamente, sugiriendo que el ELISA-LipL32 es altamente reproducible. En muestras de campo, el ELISA-LipL32 detectó anticuerpos en 55/57 (96.5%) muestras de plasma, mientras que una PCR en tiempo real para LipL32 detectó 45/57 (78.9%) muestras positivas. Los resultados indican que el ELISA-LipL32 tiene potencial para ser utilizado como un método simple, seguro, preciso y de bajo costo para el diagnóstico temprano de leptospirosis en perros. Se requieren estudios adicionales para la validación clínica en muestras de campo bajo diferentes escenarios epidemiológicos.

Palabras clave: Leptospirosis, perros, ELISA, LipL32

INTRODUCTION

Leptospirosis is the most widespread zoonotic disease in the world affecting over 1 million people every year. The majority of the reports of leptospirosis occur in adults ranging 20-49 years of age from poor regions of the world and from regions lacking of appropriate surveillance programs for this disease (Costa *et al* 2015). In Latin America, leptospirosis are routinely reported in 24 out of 48 countries but only 18 nations from that region had a government mandatory notification system, resulting in a limited geographical knowledge of the epidemiology of leptospirosis and an underestimation of the real morbidity and mortality of the disease in the Americas (Costa *et al* 2012). In México, Leptospirosis is a mandatory reportable disease in humans, however; the information regarding the epidemiological situation of the disease in domestic or companion animal species is very limited. *Pathogenic leptospiras chronically infect a wide range of companion, domestic, and wild animal species, shedding the spirochetes into the environment via urine, where the spirochetes can survive for weeks or months until an incidental host is infected upon contact and penetration through mucosal membranes, skin abrasions, or lacerations (Ko et al 2009). Humans can become accidentally infected by contact with contaminated soil or water and from urine of infected animal reservoirs (Miraglia et al 2013).* Dogs are frequently exposed to zoonotic pathogens and become infected by direct or indirect contact with other wild or domestic infected animal reservoirs in their immediate outdoor environment (Davis *et al* 2008). This contamination might lead to an infection that bring *Leptospira* into the household, increasing the risk of zoonotic transmission of the disease between dogs and their owners by direct contact with leptospiras shed through the urine or present in another common contaminated sources like water (Gay *et al* 2014).

Early detection and diagnosis of *Leptospira* infection must be achieved in order to establish appropriate control measures (Courdurie *et al* 2017). For many years, the microscopic agglutination test (MAT) has been used as the gold standard for the diagnosis of leptospirosis; however, given its technical complexity, time consuming and the biosecurity risks associated to maintain pure strains of pathogenic *Leptospira* to obtain whole cell antigens, MAT is performed only at reference laboratories where highly trained personal and appropriate biosecurity procedures are available (Chen *et al* 2013, Nilofa *et al* 2015). It has been demonstrated that MAT has low sensitivity when is used within the first 10 days of

infection and require the testing of acute and convalescent samples to obtain better sensitivity levels, limiting the use of MAT only for confirmation of infection with *Leptospira* once the antibodies have raised to detectable levels in the patient (Limmathurotsakul *et al* 2012). To overcome the limitations of MAT, several ELISA platforms for the diagnosis of leptospirosis has been developed based on the use of whole cell antigens for detection of antibodies (Niloofa *et al* 2015, Kitashoji *et al* 2015), or by the use of specific antibodies to detect circulating leptospiras in serum or plasma samples (Courdurie *et al* 2017, Kitashoji *et al* 2015). More recently, a number ELISA platforms have been developed based on highly specific recombinant proteins of *Leptospira* for the diagnosis of leptospirosis in both humans (Courdurie *et al* 2017, Chen *et al* 2013, Kitashoji *et al* 2015) and different animal species such as bovine (Bomfim *et al* 2005), equine (Ye *et al* 2014^a), swine (Hartleben *et al* 2013), and dogs (Ye *et al* 2014^b), with similar or higher sensitivity and specificity levels than MAT. The use of the adhesion protein LipL32, a highly conserved immunodominant protein expressed only in pathogenic species of *Leptospira* (Murray 2012), has been successfully adapted into different serological platforms for the diagnosis of leptospirosis in humans (Chen *et al* 2013) and animals (Bomfim *et al* 2005, Ye *et al* 2014^a, Hartleben *et al* 2013).

In this work, we hypothesize that recombinant protein LipL32 (rLipL32) expressed in baculovirus can be adapted as antigen for ELISA, that rLipL32 is capable to bind to antibodies produced as a result of *Leptospira* infection in dogs and can be used for the serological diagnosis of canine leptospirosis. The objective of this study was to develop an indirect ELISA system using rLipL32 protein expressed in baculovirus as solid phase antigen for the serological diagnosis of canine leptospirosis in plasma samples.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study

The development and standardization of the ELISA-rLipL32 were performed at the Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, in Northwest Mexico. Mexicali is the capital city of the state Baja California (32°39'48''N 115°28'04''W) and shares the international border line with the state of California in the southwest United States of America.

Recombinant protein LipL32

The design of rLipL32 protein was based on the sequence of the LipL32 gene from *Leptospira interrogans* strain 200901482 (GenBank accession number JN683904.1), a 474 base pair (bp) gene that encodes for a protein of 158 amino acids (GenBank accession number AEZ53279.1). Expression and synthesis of rLipL32 was performed by GenScript (Piscataway, NJ, USA) using a baculovirus expression system. Briefly, the original sequence JN683904.1 was codon optimized and an 8-His tag added at the amino terminal of the DNA molecule. The optimized target DNA sequence of LipL32 was synthesized and sub-cloned into the pFastBac1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for insect cell expression. Max Efficiency DH10Bac competent cells were used for the generation of recombinant bacmid DNA and transfected into Sf9 insect cell culture. Sf9 cell cultures were incubated in Sf-900 II serum-free, protein-free insect cell culture medium for 5 to 7 days at 27°C. Cell cultures were harvested and centrifuged and the collected supernatant was designated as the P1 viral stock. A P2 amplified viral stock was produced for infection. For expression of rLipL32, the P2 amplified viral stock was optimized for infection of Sf9 cell cultures at 0.5, 3, and 5 moieties of infection (MOI) and harvested at 48, 72, and 96 hours post infection. Cell pellets were harvested and lysed using a proper cell lysis buffer. Cell lysates were incubated with Ni-NTA columns to capture rLipL32 target protein. Eluted fractions were pooled, dialyzed, and analyzed by SDS-PAGE and western blot using standard protocols for molecular weight and purity measurements. The primary antibody for western blot was a mouse-anti-His horseradish peroxidase (HRP) labeled monoclonal antibody. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard. A batch of 3.6 mg of rLipL32 with a concentration of 0.20 mg/mL and purity of 80% estimated by densitometry analysis of the Coomassie blue-stained SDS-PAGE was produced and delivered by GenScript.

Positive and negative controls

For the standardization of the ELISA-LipL32, a pool of blood serum samples positive to *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* with a MAT titer of 1:400 was used as positive control. The serum samples of this pool of sera were obtained from a previous study conducted in Culiacan, Sinaloa, Mexico (Herández-Ramírez *et al* 2017), were 165 serum samples from household dogs were tested by MAT to detect antibodies to *Leptospira* obtaining a 9% seroprevalence. From the same study, a pool of blood serum samples tested

negative to MAT using a panel of *Leptospira* serovars *Canicola*, *Ballum*, *Hardjo*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Icterohaemorrhagiae*, *Bratislava*, *Wolffii*, *Australis*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis* and *Shermani* were used as negative control for the standardization of the ELISA-LipL32. Positive and negative serum samples used in this study were previously tested for *Leptospira* antibodies using MAT at the National Animal Health Centre in Tecamac, State of Mexico.

rLipL32 ELISA protocol

The rLipL32 protein was standardized for use as solid phase antigen for the detection of antibodies in an indirect ELISA system. Optimal rLipL32 protein antigen concentration, serum samples and enzyme conjugate antibody dilutions, were determined through standard checkerboard titration procedures (Naslund *et al* 2014). Briefly, rLipL32 protein antigen was diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 at a concentration of 200, 100, 50, 25, 10, and 5 ng per well. After incubation overnight at 4°C plates were ready to use. To run the tests, plates were washed 5 times with phosphate buffered saline solution pH 7.5 containing 0.05% Tween 20 (PBST). Positive and negative controls were diluted 2-fold from 1:25 to 1:200 and added in duplicates to appropriate wells. After incubation at 37°C for 1 hour, plates were washed as described before and 100 µL of anti-dog IgG HRP conjugate diluted 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000 1:40,000 and 1:80,000 in PBTS added to individual plates. Followed another round of incubation and washing, 100 µL of substrate solution (TMBS) (Sigma-Aldrich) were added to each well and color development stopped with 30 µL per well of 0.16M sulfuric acid solution after 10 minutes of incubation at room temperature. Optical density (OD) values were obtained at 450 nm using an automated ELISA reader. **The selection criteria for the best performance of the rLipL32 ELISA system was determined based on the amount of antigen per well, dilution of serum and dilution of the enzyme conjugate that resulted in the maximum amplitude of difference between the mean OD value of the positive control serum over the mean OD value of the negative control serum, expressed as the positive/negative ratio (P/N ratio).**

Precision of the ELISA-rLipL32

Eight aliquots of the pooled positive control sera to and 8 aliquots of the pooled negative control sera to *Leptospira* from the ELISA-LipL32 standardization experiments were tested in duplicates at random positions across the 96 wells of microtiter plates during 5 non-consecutive days. From the results, mean OD, standard deviation (SD) and coefficient

of variation (CV) were calculated to obtain the repeatability of serum samples tested on the same plate (intra-assay variation) and on different plates at different times (inter-assay repeatability). A CV value less than 20% was considered to produce acceptable variation (Andreasson *et al* 2015).

Dynamic range and linearity of the ELISA-LipL32

Upper and lower limit of detection and dilution linearity were calculated to establish the working range of the ELISA-LipL32 that produce a reliable result. Two-fold serial dilutions of the pooled positive control sera were tested from dilution 1:25 (working dilution) to 1:6,400. One set of the pooled negative control sera to *Leptospira* diluted 1:25 and one set of blanks of PBST were included in the test run. All positive, negative, and blank samples were run in octuplicates in a microtiter plate.

ELISA-rLipL32 with field samples

A total of 57 plasma and urine samples collected from stray dogs captured by the Mexicali County Animal Control Center (MCACC) between March and July of 2017 were included in this work. From that group of samples 45 tested positive and 12 negative to a *Leptospira* LipL32 real-time PCR (rtPCR-LipL32) diagnostic platform performed in urine samples. Plasma samples corresponding to the 45 positive and 12 negative rtPCR-LipL32 urine samples were tested to detect antibodies to *Leptospira* using the ELISA-rLipL32 and the results of both tests compared. A positive cut-off value with an OD ≥ 0.750 was used to compare the results of both tests. That cut-off value corresponds to 50% the mean OD value of the positive control samples resulted for the optimization of the ELISA-LipL32.

Data analysis

Data analysis was performed using the Statistical Analysis Systems (SAS) version 9.4. (SAS Institute, North Carolina, USA)

RESULTS

ELISA-rLipL32 protocol optimization

The maximum P/N ratio with the lowest background noise of the ELISA-LipL32 was established in 7.18 with a mean OD for the positive control of 1.487 and a mean OD of 0.207 for the negative control (Table 1). These results were obtained using 5 ng of rLipL32 protein

antigen per well, the serum samples diluted 1:25 and the conjugate diluted 1:40,000. Incubation of primary and secondary antibody was performed at 37°C for 1 hour each, followed by 10 minutes of incubation with TMBS at room temperature.

Precision of the ELISA-LipL32

Eight positive and 8 negative aliquots of canine sera were tested during 5 non-consecutive days for intra-assay and inter-assay variation to evaluate the repeatability of the ELISA. Results showed an intra-assay CV of 6.98% (4.13-11.20%) and an inter-assay CV of 3.96% (2.12-8.60%). These data suggests that ELISA-LipL32 has the capacity to generate highly reproducible results with low variation.

Dynamic range and linearity of the ELISA-LipL32

The higher mean OD value detected during the intra-assay and inter-assay experiments was 1.670, corresponds to a positive pooled plasma sample diluted 1:25 and it was established as the upper limit of detection. The lower OD detected was 0.195, corresponds to the positive pooled plasma sample diluted 1:6,200 and it was regarded as the lower limit of detection (Figure 1).

Dilution linearity

To obtain the dilution linearity of the ELISA-LipL32, the mean OD of 2-fold sample dilution series were plotted and a regression curve (R^2) calculated. The results shown a linearity curve with an R^2 value of 0.9901 ($p < 0.001$), demonstrating that rLipL32 is capable to allow the reliable determination of antibody levels in diluted plasma samples within the OD dynamic range established for this method (Figure 1).

Comparison of the ELISA-LipL32 with an rtPCR-LipL32 in field samples

The ELISA-LipL32 was capable de detect antibodies to *Leptospira* ($OD \geq 0.750$) in 55/57 plasma samples collected from stray dogs while the rtPCR-LipL32 produced a positive amplification result in only 45 corresponding urine samples. The two samples tested negative with the ELISA-LipL32 were also negative in the rtPCR-LipL32. The results show that the ELISA-LipL32 was capable to detect 10 additional cases than the rtPCR-LipL32 method, making this ELISA a more efficient serological method compared to the rtPCR targeting the LipL32 gene for the early detection of *Leptospira* infection using plasma samples.

DISCUSSION

Accurate detection and diagnosis of a *Leptospira* infection is important to the prompt initiation of the antibiotic therapy and to minimize the spread of the disease. A delay in the diagnosis represents a significant challenge for human and veterinary public health authorities facing the possibility of an epidemic outbreak of leptospirosis, especially in regions where the pathogen is emergent. MAT is considered the reference serological method used to diagnose leptospirosis. However, because of the low sensitivity of the test MAT is considered a poor gold standard for comparison of other diagnostic tests for leptospirosis (Limmathurotsakul *et al* 2012). MAT procedure is laborious, expensive, requires of stocks of live leptospiras and must be carried out in specialized reference laboratories with high level bio-containment facilities; consequently it is rarely used in most developing countries (Chen *et al* 2013). PCR based molecular methods are very sensitive and specific for the diagnosis of *Leptospira* but, given the short period of the bacteriuria in infected dogs, the usefulness of this technology for early diagnosis of the disease is limited to the first 10-12 days after infection (Ko *et al* 2009). Additionally, rtPCR diagnosis of *Leptospira* requires well equipped laboratories which might be beyond the resources and capabilities of clinical and diagnostic laboratories in many developing countries. Antibody detection by ELISA for the diagnosis of *Leptospira* is widely used and the rising number of reports for leptospirosis world-wide resulted in an increased demand for rapid, safe and affordable diagnostic methods for the accurate detection of leptospirosis (Ye, *et al* 2014; Suman 2014). The development of recombinant proteins is one approach suitable for the safe production of high quality ELISA reagents given that are easily expressed, produced and standardized with high degree of consistency between batches without the biosecurity risks associated to the extraction of leptospiral antigens from pure microbiological culture preparations (Chen *et al* 2013; Ye *et al* 2014^a).

Here, we developed an ELISA based on a baculovirus recombinant LipL32 protein with potential application as diagnostic antigen in an indirect ELISA system for detection of antibodies in dogs plasma samples. The LipL32 protein was chosen as a test antigen for the ELISA because it is an immunodominant protein exclusively expressed for pathogenic species of *Leptospira* (Bomfim and Koury, 2005; Ye *et al* 2014^b; Murray 2012). The cloning, expression and purification methods for the production of the rLipL32 protein described in this work resulted in a technically simple, cost effective production of a highly reliable, very

stable and noninfectious antigen for ELISA. The rLipL32 protein strongly bound to the ELISA plates generating minimal background, thus producing an effective differentiation between the positive from the negative controls tested showing an ample P/N ratio of 7.18. Considering the working dilution of the rLipL32 protein antigen for the ELISA optimized at 5 ng per well, a batch of one milligram of and 80% purity rLipL32 protein like the one evaluated here, would be enough to test approximately 100,000 duplicate plasma or serum samples for detection of antibodies to *Leptospira*, making the ELISA-LipL32 an inexpensive platform to the accurate detection of leptospirosis in dogs and possibly in other animal species.

Dilution linearity experiments resulted in a strong correlation ($R^2 = 0.9901$; $p < 0.001$), determining to which extent the response of the diluted sample is linear through the working range of the test with no effect over the precision (Andreasson *et al* 2015). The linearity strength of the ELISA-LipL32 system presented here, will be of great value for the analysis and characterization of the antibody response from animals living under different epidemiological situations such as urban or rural setting, stray dogs or household dogs, age, gender, vaccination status, antibiotic treatments and others variables that might help to achieve the field validation of the ELISA-LipL32 in the future.

The ELISA-LipL32 was capable to detect antibodies to *Leptospira* rLipL32 in 10 additional plasma samples then the rtPCR-LipL32 method based on urine samples. This can be explained because of the fact that after infection, *Leptospira* rapidly proliferates in the blood stream developing an acute phase that lasts for 10-12 days, when molecular diagnostic methods are capable to produce a positive result (Ye *et al* 2014^a). On the other hand, antibodies can be detected in blood as early as by the 6th to 10th day post infection, which coincides with the clearance of *Leptospira* from the blood stream. Antibodies will continue to rise and reach peak levels 3-4 months after infection (Suman 2014) thus, more cases of leptospirosis can potentially be detected by using serological than molecular methods.

Finally, the high rate (>80%) of plasma samples tested using the ELISA-LipL32 developing an OD >1.00, added to the 45 urine samples that resulted positive to the rtPCR-LipL32 method, strongly suggests evidence of active infection in the stray dog population with possible shedding of *Leptospiras* into the environment via urine indicating a potential risk for human and household dog's exposure to the disease Gay *et al* 2014).

The results of the present work indicate that the ELISA-LipL32 may be a reliable tool for early diagnosis of leptospirosis and has the potential to be used by veterinarians and public health investigators as a safe, accurate and inexpensive method for the early diagnosis of *Leptospira* infection in dogs, to study the epidemiology of this disease and to evaluate current sanitary strategies for control and prevention of leptospirosis. Further studies oriented to achieve clinical validation on field samples under different epidemiological scenarios are still required.

REFERENCES

- Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, *et al.* 2015. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol* 9, Article 179. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>.
- Bomfim MRQ, Ko A, Koury MC. 2005. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* 109, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.002>.
- Chen H-W, Zhang Z, Halsey ES, Guevara C, Canal E, *et al.* 2013. Detection of *Leptospira*-Specific Antibodies Using a Recombinant Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg* 89, 1088-1094. <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.13-0041>.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, *et al.* 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9, 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- Costa F, Martinez-Silveira MS, Hagan JE, Hartskeerl RA, dos Reis MG, *et al.* 2012. Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996 - 2005: a review of data from ministries of health. *Rev Panam Salud Publica* 32, 169-177. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970205/>.
- Courdurie C, Le Govic Y, Bourhy P, Alexer D, Pailla K, *et al.* 2017. Evaluation of different serological assays for early diagnosis of leptospirosis in Martinique (French West Indies). *PLoS Negl Trop Dis* 11, 1-14. e0005678. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500375/>.
- Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VanderSchalie J, Besser TE, *et al.* 2008. Serological Survey for Antibodies to *Leptospira* in Dogs and Raccoons in Washington State. *Zoonoses Public Health* 55, 436-442. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2008.01137.x>.
- Gay N, Soupe-Gilbert M-E, Goarant C. 2014. Though not Reservoirs, Dogs might Transmit *Leptospira* in New Caledonia. *Int J Environ Res Public Health* 11, 4316-4325. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404316>.

- Hartleben CuP, Leal FMA, Monte LG, Hartwig DD, Seixas FK, *et al.* 2013. Serological Analysis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Antigen LipL32 for the Diagnosis of Swine Leptospirosis. *Curr Microbiol* 66,106-119. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0237-x>.
- Hernández Ramírez CV, Gaxiola Camacho SM, Osuna Ramírez I, Enríquez Verdugo I, Castro del Campo N, *et al.* 2017. Prevalence and risk factors associated with serovars of *Leptospira* in dogs from Culiacan, Sinaloa. *Vet Mexico* 4, 32-43. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-67602017000200032&nrm=iso.
- Kitashoji E, Koizumi N, Lacuesta TLV, Usuda D, Ribo MR, *et al.* 2015. Diagnostic Accuracy of Recombinant Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis* 9, 1-13 e0003879. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482399/>
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009. *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7, 736-747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3384523/>.
- Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, *et al.* 2012. Fool's Gold: Why Imperfect Reference Tests Are Undermining the Evaluation of Novel Diagnostics: A Reevaluation of 5 Diagnostic Tests for Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 55, 322-331. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis403>.
- Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas Fkm, *et al.* 2013. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77, 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003>.
- Murray GL. 2012. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol* 162, 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.005>.
- Naslund K, Blomqvist G, Vernersson C, Zientara S, Breard E, *et al.* 2014. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. *Acta Vet Scand* 56, 1-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4268875/>.

- Niloofa R, Fernando N, de Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, *et al.* 2015. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. *PLoS One* 10, 1-12. e0129236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129236>
- Suman Veerappa Budihal KP. 2014. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. *J Clin Diagn Res* 8, 199-202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129236>.
- Ye(a) C, Yan W, McDonough PL, McDonough SP, Mohamed H, *et al.* 2014. Serodiagnosis of Equine Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Four Recombinant Protein Markers. *Clin Vaccine Immunol* 21, 478-483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993115/>.
- Ye(b) C, Yan W, Xiang H, He H, Yang M, *et al.* 2014. Recombinant Antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for Serological Diagnosis of Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays in Dogs. *PLoS One* 9, 1-14. e111367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4272274/>.

Table 1. Optimization of the ELISA-LipL32 using MAT positive and negative control serum samples.

	Mean OD ^b	SD ^d	CV ^a	P value	P/N ratio ^c
Positive					
Control	1.487	0.1067	7.1762	<0.0001	
N = 40					7.18
Negative					
Control	0.207	0.0127	6.1429	<0.0001	
N = 40					

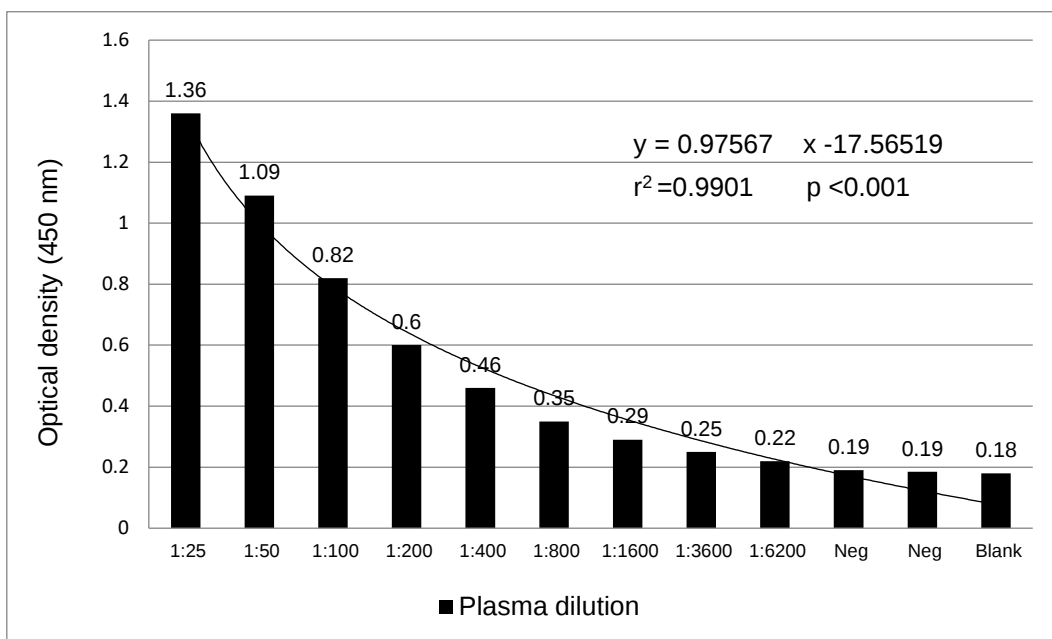
^aCV = Coefficient of variation

^bMean OD = Mean optical density

^cP/N ratio= Positive / negative ratio

^dSD = Standard deviation

Chart 1. Linear dilution performance of the ELISA-LipL32



Two-fold serial diluted plasma samples were tested using the optimized ELISA-LipL32, the results showed a strong dilution linearity ($R^2 = 0.9901$, $p < 0.001$) in diluted samples with no effect over the precision of the test. The mean OD at dilution 1:6400 is just above the mean OD of the negative control and blank samples.

3.2 Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema cerenae* in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis

Journal of Apicultural Research

Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema cerenae* in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis –Manuscript Draft–

Full Title:	Prevalence and geographical distribution of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema cerenae</i> in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis
Manuscript Number:	
Article Type:	Original research article
Keywords:	<i>Nosema apis</i> ; <i>Nosema cerenae</i> ; real-time PCR; melting-curve analysis; prevalence; Northwest Mexico
Manuscript Classifications:	Bee management; Ecology and conservation; Hive product science; Pathology and parasitology; Pollination
Abstract:	In Mexico, beekeeping is an important socioeconomic activity in many rural regions currently facing various health situations, being the presence of infectious diseases the main problem of beekeeping in our country. The aim of our study was to optimize a duplex Eva Green RT-PCR assay along with melting-curve analysis to detect and differentiate <i>N. apis</i> from <i>N. cerenae</i> infection in honey bees at four locations in Northwest Mexico. 765 samples from 76 apiaries were tested using a RT-PCR and melting-curve analysis. Infection was detected in all the four geographical regions under study. Overall, 87.32% samples resulted positive for <i>N. apis</i>, 12.68% for <i>N. cerenae</i> and 10.20% resulted co-infected with both microsporidians. The Mexicali valley resulted with the highest prevalence of <i>N. apis</i> with 56.68% positive apiaries while Ensenada shown the lowest prevalence with 7.89 positive apiaries. The highest prevalence of <i>N. cerenae</i> was detected in Mexicali with 15.79% while Tijuana and San Luis Rio Colorado shown the lowest prevalence with 1.32%, respectively. Our work indicate a wide spread of nosemiosis in all the four geographical regions with a marked dominion of <i>N. apis</i>. The RT-PCR assay resulted highly specific and accurate for the detection of <i>N. apis</i> and <i>N. cerenae</i> and could provide a rapid and accurate diagnostic tool for the simultaneous detection and discrimination of both microsporidians. It can also be used for clinical diagnostics and disease surveillance and to evaluate the effectiveness of the measurements for control and prevention of Nosemiosis in the Northwest corner of Mexico.
Order of Authors:	Francisco Javier Monge Navarro, Ph.D. Sergio Arturo Cueto González, Ph.D. Gilberto López Valencia, Ph.D. Carolina Orozco Cabrera, M.Sc. Sergio Daniel Gómez Gómez, M.Sc. Kattya Moreno Torres, DVM Kelvin Orlando Espinoza Blandón, M.Sc. José Guadalupe Guerrero Velázquez, M.Sc. Laura Elena Silva Paz, M.Sc. Enrique Trasviña Muñoz, M.Sc.

Table

1

RT-PCR	<i>N. apis</i>	<i>N. cerenae</i>
Average Ct of positive controls	23.99	29.01
Average Ct of negative controls	No amplification observed	No amplification observed
Ct range of field samples	Low 14.19 High 31.38	Low 18.60 High 38.10

2

3 Table 1. Cycle threshold of amplification of positive controls, negative controls and field
4 samples obtained by the duplex RT-PCR assay for *N. apis* and *N. cerenae*

5

Figure

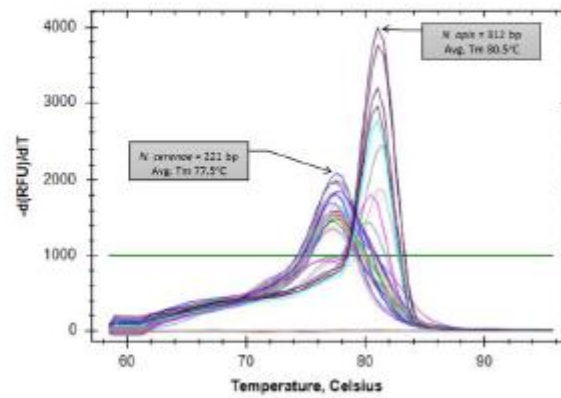
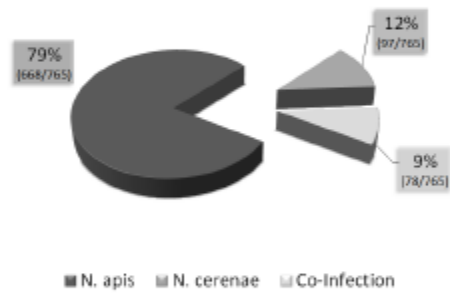


Figure 1. Melting-curve analysis of *N. apis* and *N. ceranae*. Duplex Eva Green RT-PCR assay optimization for *N. apis* and *N. ceranae* showing specific melting temperature (Tm) peaks of 77.5 °C (Tm range 75.3 °C to 78.4 °C) for *N. ceranae* while for *N. apis* average Tm peak was 80.5 °C (Tm range 78.6 °C to 81.1°C) from DNA reference controls provided by CENAPA and field samples from bees of Northwest Mexico.

Figure

1



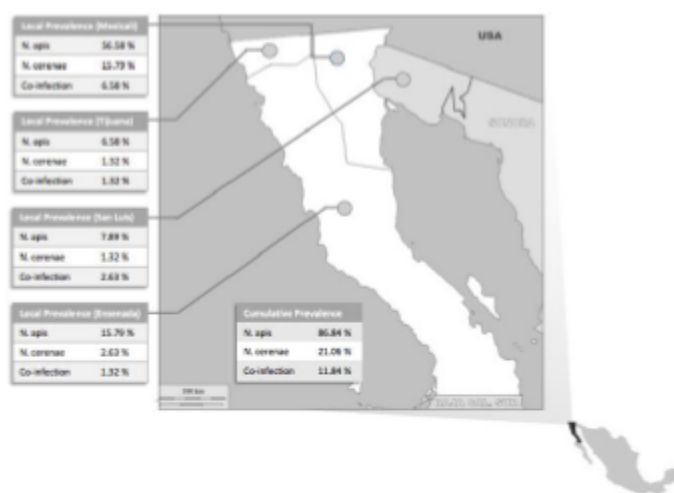
2

3 Figure 2. Overall prevalence of *N. apis* and *N. cerenae* in field samples using the duplex Eva
4 Green RT-PCR assay. Infection due *N. apis* showed to be the dominant microsporidian infection
5 in apiaries of Northwest Mexico.

6

Figure

1



2

3 Figure 3. Prevalence and geographical distribution of *N. apis* and *N. cerenae* in four major
 4 regions of Northwest Mexico using the duplex Eva Green RT-PCR assay. The Mexicali
 5 agricultural valley accounts of over 80% of the apiaries of the Northwest region of Mexico and
 6 resulted with the higher prevalence of both *N. apis* and *N. cerenae*.

Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema cerenae* in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis

Sergio Arturo Cueto González ⁽¹⁾, Gilberto López Valencia ⁽¹⁾, Carolina Orozco Cabrera ⁽¹⁾, Sergio Daniel Gómez-Gómez ⁽¹⁾, Katty Moreno Torres ⁽¹⁾, Kelvin Orlando Espinoza Blandón ⁽¹⁾, José Guadalupe Guerrero-Velázquez ⁽¹⁾, Laura Elena Silva Paz ⁽¹⁾, Enrique Trasviña-Muñoz ⁽¹⁾ and Francisco Javier Monge-Navarro ⁽¹⁾ (*)

(1) Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico
Address: Km. 3.5 Carretera a San Felipe, Fraccionamiento Campestre, Mexicali, Baja California CP 21386, México

* Corresponding Author:

Dr. Francisco Javier Monge Navarro. Academic Group in Disease Diagnostics, Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico.

Address: Km. 3.5 Carretera a San Felipe, Fraccionamiento Campestre, Mexicali, Baja California CP 21386, México.

Telephone: +52 686 1 262 0607

E-mail: fmonge@uabc.edu.mx

1
2
3
4 **Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema cerenae* in apiaries of**
5
6 **Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis**
7
8
9

10
11 **Abstract**
12
13
14
15

16 In Mexico, beekeeping is an important socioeconomic activity in many rural regions currently
17 facing various health situations, being the presence of infectious diseases the main problem of
18 beekeeping in our country. The aim of our study was to optimize a duplex Eva Green RT-PCR
19 assay along with melting-curve analysis to detect and differentiate *N. apis* from *N. cerenae*
20 infection in honey bees at four locations in Northwest Mexico. 765 samples from 76 apiaries
21 were tested using a RT-PCR and melting-curve analysis. Infection was detected in all the four
22 geographical regions under study. Overall, 87.32% samples resulted positive for *N. apis*, 12.68%
23 for *N. cerenae* and 10.20% resulted co-infected with both microsporidians. The Mexicali valley
24 resulted with the highest prevalence of *N. apis* with 56.68% positive apiaries while Ensenada
25 shown the lowest prevalence with 7.89 positive apiaries. The highest prevalence of *N. cerenae*
26 was detected in Mexicali with 15.79% while Tijuana and San Luis Rio Colorado shown the
27 lowest prevalence with 1.32%, respectively. Our work indicate a wide spread of nosemiosis in all
28 the four geographical regions with a marked dominion of *N. apis*. The RT-PCR assay resulted
29 highly specific and accurate for the detection of *N. apis* and *N. cerenae* and could provide a rapid
30 and accurate diagnostic tool for the simultaneous detection and discrimination of both
31 microsporidians. It can also be used for clinical diagnostics and disease surveillance and to
32 evaluate the effectiveness of the measurements for control and prevention of Nosemiosis in the
33 Northwest corner of Mexico.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Keywords

Nosema apis, *Nosema cerenae*, real-time PCR, melting-curve analysis, prevalence, Northwest Mexico

Introduction

Nosemosis is an infection of honey bees caused by the microsporidian pathogens *Nosema apis* (*N. apis*) and *Nosema cerenae* (*N. cerenae*). Both pathogens are cause of economic losses in managed colonies and have been recognized as major factors contributing to the reduction of honey bee populations worldwide (Charbonneau, Hillier, Rogers, Williams, & Shutler, 2015). *N. apis* and *N. cerenae* infect and multiply in the epithelial ventricular cells of adult honey bees mainly through the ingestion of contaminated honeycomb material, water, by trophalaxis, accumulation of honey in the hive and the presence of crushed infected bees may also intervene in the transmission of nosemosis.

Approximately 3-4 days after infection, large amounts of mature spores develop producing tissue degeneration and cell renewal impairment, being the two main factors responsible for high rates of mortality during *Nosema* infection (Dussaubat et al., 2012). Chronic nosemosis reduces honey production, colony survival, bee longevity, brood rearing and pollen collection leading to Colony Collapse Disorder (CCD), a syndrome characterized for a dead colony with absence of adult bees, no visible dead bee bodies and a live queen in the hive. While dysentery and crawling bees are the main symptoms of infection with *N. apis*, *N. cerenae* produces high mortality of

bees, depopulation and colony collapse that may undergo without any apparent symptoms (Paxton, 2010).

In Mexico, beekeeping is an important socioeconomic activity in many rural regions, honey and the by-products obtained from the beehive represent an alternative source of work, an additional direct income for the family economy of beekeepers and participation in the local honey production chain. However, beekeepers face various problems, being the presence of infectious diseases in their hives the main problem of beekeeping in our country. Nosemiosis was first reported in apiaries the Yucatan Peninsula in Southeast Mexico in 1980 and since then, noseimiosis has been confirmed in other regions of the country (Guerrero-Molina, Correa-Benitez, Hamiduzzaman, & Guzman-Novoa, 2016). In the Northwest region of Mexico, beekeeping has become a growing activity mainly developed in the Mexicali and San Luis Rio Colorado valleys, where 85% of the producers are located, and the rest distributed in the municipalities of Ensenada and Tijuana. Together, they contribute with approximately 3.0% of the national production of honey (SEFOA, 2009). During the last decade, commercial pollination has become the top income source for Baja's beekeepers. However, despite of the rapid development of beekeeping in Baja, information about infectious diseases affecting honey bees is not readily available and the potential impact on reduction of honey production or colony survival still to be determined.

Nosemiosis is routinely diagnosed by observation of spores using light microscopy, however, *N. apis* and *N. cerenae* are morphologically similar under light microscopy with small ultra-structure differences based on the number of polar filaments (Bourgeois, Rinderer, Beaman, & Danka, 2010) so; a reliable procedure for the quick and accurate identification of *Nosema* species is needed to establish infection prevalence rates and geographical distribution of noseimiosis in

our region. The use of molecular techniques such as real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) along with species-specific primers are capable to the accurate identification of *Nosema* species in complex sample matrices containing multiple sources of DNA from different microbial species. The combined use of the melting-curve analysis (T_m), which consists in the determination of the melting point temperature of any given DNA fragment, is widely used to differentiate microbial species based on the different melting point of their PCR amplified product (Burgher-MacLellan, Williams, Shutler, MacKenzie, & Rogers, 2010) Thus, this methodology is sensitive, quick and accurate for the diagnosis of *Nosema* species in honey bees. The aim of our study was to optimize and evaluate a RT-PCR system targeting a fragment of the 16S ribosomal gene of *N. apis* and *N. cerenae* along with the melting-curve analysis to detect and differentiate *N. apis* and *N. cerenae* infection in honey bees and determine the prevalence of the two *Nosema* species in three locations of the state of Baja California and one location from the neighbor state of Sonora in the Northwest corner of Mexico.

Materials and methods

Geographical location of apiaries and bee samples

The presence and identification of *N. apis* and *N. cerenae* in honeybee colonies from the most representative geographical regions of Northwest Mexico was investigated between march and June of 2015, corresponding to spring and early summer seasons and the peak of seasonal activity of honey bees in the region. Based on the number of registered honeybee keepers included in this study, a stratified randomized design was applied resulting in the selection of 76

1
2
3
4 apiaries and a total of 765 samples collected from the three main geographical regions of Baja:
5
6 Mexicali (31° 45' 0" N, 115° 15' 0" W), Ensenada (30° 00' N, 115° 30' 0" W), Tijuana (32° 31'
7
8 30" N, 117° 00' 0" W) and San Luis Rio Colorado (32° 28' 36" N, 114° 45' 45" W) from the
9
10 neighbor state of Sonora. From each apiary, 10 hives were sampled and 50 to 300 adult bees
11
12 collected, placed in 50 ml conical tubes containing 70% ethanol, transported to the Parasitology
13
14 Laboratory of the Institute for Research in Veterinary Sciences (IICV) at Autonomous University
15
16 of Baja California (UABC) and stored at room temperature until processed for DNA extraction.
17
18
19
20
21
22

23 Intestinal tract recovery

24
25
26
27
28 The intestinal tracts from bees were processed for DNA extraction following the procedure
29
30 described by Fries (2013) with some modifications. Briefly, groups of ten bees were randomly
31
32 selected and intestinal tracts removed by pulling the last 2 abdominal segments, the material was
33
34 placed in a sterile 1.5 ml conical tube containing 0.5 ml of DNase/RNase free water and
35
36 homogenized for 60 seconds using a 1.5 ml pestle grinder, flash freeze in liquid Nitrogen for 60
37
38 seconds and heat shock in a water bath at 65 °C for 3 minutes, followed by another round of
39
40 mechanical disruption with pestle grinder. This procedure was repeated four times for each
41
42 sample. After adding an additional 0.5 ml of DNase/RNase free water to each tube and vortex,
43
44 homogenates were centrifuged at 16,000 x g for 3 minutes at room temperature (RT) to
45
46 precipitate microsporidian and other cellular material, the supernatant was discarded and the
47
48 pellet resuspended in 200 µl of DNase/RNase free water and stored at -20 °C until DNA
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65 extraction.

DNA extraction

Extraction of DNA was performed from intestinal tract homogenates using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison WI) following manufacturer's guidelines. Briefly, using a sterile 1.5 ml conical tube, 100 µl of intestinal tract homogenate were added to 600 µl of nuclei lysis solution to plus 10 µl of 20 mg/ml Proteinase K, gently mixed by pipetting up and down and incubated at 37 °C for 30 minutes. After cooling down for 10 minutes at RT, 200 µl of protein precipitation solution were added, mixed by vortex, incubated on ice for 5 minutes and centrifuged at 16,000 x g for 4 minutes. The supernatant was then transferred to a new, sterile 1.5 ml conical tube containing 600 µl of isopropanol and gently mixed by inversion, centrifuged again at 16,000 x g for 1 minute to precipitate the DNA, after discard the supernatant, and adding another 600 µl of RT 70% ethanol to wash the DNA tubes were centrifuged at 16,000 x g for 1 minute at RT. After aspiration of ethanol the tubes were air dry into a Class II cabinet for 15 minutes and DNA resuspended in 100 µl of DNA rehydration solution overnight at 4 °C and stored at -20 °C until RT-PCR testing.

Eva Green RT-PCR adaptation and optimization

A single tube, duplex RT-PCR assay was adapted and reaction conditions optimized from the procedure reported by Fries et al. (2013) and Martin-Hernandez et al. (2007) for the accurate detection of *N. apis* and *N. cerenae*. The assay amplify a 312 base pair (bp) fragment of the 16 small subunit ribosomal gene (16S rRNA) of *N. apis* (GenBank: DQ235446.1) using the positive sense oligonucleotide: 5'-GCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3' and the negative sense

oligonucleotide 3'-CATAGTTGTTTCACATTTTAAACG-5' which produces an amplicon of an estimated T_m of 78.6 °C to 81.1°C. For *N. cerenae* a 221 bp fragment of the 16S rRNA gene (GenBank: DQ329034.1) was amplified using the positive sense oligonucleotide: 5'-CGACGATGTGATATGGAAAATATTAA-3' and the negative sense oligonucleotide 3'-CGGTTTTTTGTTTGAGAATGA-5' which produces an amplicon of an estimated T_m of 75.3 °C to 78.4 °C. The T_m for the amplicon sequences of *N. apis* and *N. cerenae* were calculated using the OligoCalc tool (Kibbe, 2007) and the oligonucleotides were synthesized by Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada).

RT-PCR reactions were performed in a BioRad CFX 96 Connect thermal cycler (BioRad, Hercules, CA). The RT-PCR procedure for *N. apis* and *N. cerenae* was optimized by testing each set of oligonucleotides at 100nM, 200 nM, 400 nM and 800 nM with 1 µl, 2 µl and 3 µl of template DNA. Denaturing, annealing and extension temperatures as well as reaction time were calculated to each set of primers and amplicon using the Bio Rad CFX software. For the duplex RT-PCR, annealing and extension temperatures were optimized using a gradient from 52.0 °C to 60.0 °C. Once the RT-PCR conditions were optimized, samples were tested in a 20 µl reaction containing 10.0 µl of 2x Eva-Green Forget-Me-Not Universal Master Mix (Biotium, Freemont, CA), 1 µl of 400 nM of each forward and reverse oligonucleotide, 2 µl of template DNA and 4 µl of DNase/RNase free water. The positive and negative DNA reference controls for *N. apis* and *N. cerenae* were provided by the National Center for Animal Health Monitoring Services (CENAPA, Cuernavaca, Mexico). Positive and negative controls were tested in triplicates and DNA samples in duplicates. An additional non-template control containing 1x master mix in DNase/RNase free water were also added in duplicates as negative controls at random block locations in each test run. Thermal cycler conditions for simultaneous amplification of *N. apis*

and *N. cereinae* included an initial denaturing cycle of 96 °C for 5 minutes followed by 39 cycles of denaturing at 95 °C for 10 seconds, annealing at 59.0 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 15 seconds. To ensure reaction specificity, a melting-curve analysis was included in each run and plotted as the derivative change in fluorescence divided by the change in temperature ($-R'(T)$) versus temperature (T) to show individual melting curves with peak melting temperatures. Temperature for melting curves started at 65 °C to 95 °C with increments of 0.5 °C (Burgher-MacLellan et al., 2010). Samples were considered positive when the threshold cycle (Ct) value was ≤ 40 , the curve in the amplification plot showed an exponential increase, and a specific melting curve temperature matching with those of the positive *N. apis* or *N. cereinae* controls in the same run were obtained.

Prevalence rates were calculated as follows:

$$\text{Prevalence (\%)} = [(\text{number of positive samples}) / (\text{number of samples})] * 100$$

Results

Real-time PCR and Tm optimization

The best performance of the single plex or duplex Eva Green RT-PCR assay was obtained mixing the two sets of oligonucleotides at a concentration of 400 nM with 2 µl of template DNA in a final volume of 20 µl in 1x Eva Green master mix per reaction. The average threshold cycle (Ct) of amplification for the positive controls of *N. apis* was 23.99 whereas for *N. cereinae* the average Ct for was 29.01. None of the negative reference controls or non-template controls

developed any observable curve of amplification. The Ct value of DNA field samples ranged from 14.19 to 31.38 for *N. apis* and from 18.60 to 38.10 for *N. cerenae* (Table 1).

Sensitivity of the duplex real-time PCR

The analytical sensitivity of the Eva Green duplex RT-PCR assay was determined by testing serial dilutions of the DNA reference controls of *N. apis* and *N. cerenae*. A linear relationship was calculated between the amplified plasmid DNA and the threshold cycle (Ct) obtaining a regression coefficient (R^2) greater than 0.99 for both of the pathogens (Data not shown).

Specificity of the real-time PCR

The assay was specific since no other curves of amplification were observed during the test runs and the amplified curves developed for the DNA reference controls or the field samples considered positive were within the estimated range for melting peak temperatures. RT-PCR amplification fragments for *N. apis* and *N. cerenae* were easily differentiated by their specific T_m values. For *N. apis* the average T_m was 80.5 °C and for *N. cerenae* the average T_m was 77.5 °C (Figure 1).

Prevalence of *N. apis* and *N. cerenae*

A total of 765 DNA samples extracted from bee pooled intestinal tracts were tested using the duplex Eva Green RT-PCR assay for *N. apis* and *N. cerenae*. Infection was detected in all the four geographical regions under study. Overall, 668/765 field samples resulted positive for *N.*

apis for a regional prevalence of 87.32 %; while for *N. cerenae* 97/765 field samples resulted positive for a regional prevalence of 12.68 % and 78/765 field samples resulted positive for both pathogenic microsporidians for a regional prevalence of 10.20 % (Figure 2).

Geographical distribution of *N. apis* and *N. cerenae*

By geographical location, *N. apis* was detected in 43/76 apiaries in the Mexicali valley for a local prevalence of 56.58 %, followed by Ensenada with 12/76 apiaries and a local prevalence of 15.79%, Tijuana with 5/76 apiaries for a 6.58 % local prevalence and San Luis Rio Colorado with 6/76 apiaries and 7.89 % local prevalence. The cumulative apiary prevalence of *N. apis* in all four geographical locations was 86.84 %. *N. cerenae* was detected in 12/76 apiaries in the Mexicali valley for a local prevalence of 15.79 %, Ensenada with 2/76 apiaries and a local prevalence of 2.63 %, Tijuana with 1/76 apiaries and 1.32 % local prevalence and San Luis Rio Colorado with 1/76 apiaries for a 1.32 % local prevalence. The cumulative apiary prevalence of *N. cerenae* for all four geographical locations was 21.06 %. Additionally, the results shown simultaneous infection of *N. apis* and *N. cerenae* in 5/76 apiaries from the Mexicali valley for a co-infection prevalence of 6.58 %, 1/76 apiaries from Ensenada for a co-infection prevalence of 1.32 %, 1/76 apiaries from Tijuana for a co-infection prevalence of 1.32 % and 2/76 apiaries from San Luis Rio Colorado for a co-infection prevalence of 2.63 %. The cumulative co-infection prevalence of *N. apis* and *N. cerenae* for all four geographical locations was 11.84 % (Figure 3).

Discussion

1
2
3
4
5
6
7 In the present study we report the successful adaptation of a highly specific and accurate duplex
8
9 RT-PCR assay based on Eva Green chemistry and the use of the melting-curve analysis,
10
11 allowing a clear identification and differentiation of both *N. apis* and *N. cerenae*. The
12
13 optimization of the primers and the resulted amplicon developed in the assay presented here,
14
15 along with the use of a melting-curve analysis, produced a clear differentiation of 3 °C of each
16
17 amplified PCR product, resulting in a plot with two separate, well defined amplification curves
18
19 specific for *N. apis* and *N. cerenae*, establishing an accurate discrimination between both
20
21 microsporidians and making this assay a strong, accurate and reliable tool for the diagnosis of
22
23 Nosemosis in our region (Figure 1).
24
25
26
27
28
29
30

31
32 The diseases produced by *N. apis* and *N. cerenae* have been recognized worldwide as serious
33
34 health problem with important economic implications for the bee industry. In order to propose
35
36 control measurements in an infected region, it is imperative to determine the type of Nosema as
37
38 fast and accurate as possible. Since *N. apis* and *N. cerenae* spores are morphologically very
39
40 similar, discrimination between one and other using standard microscopy techniques is very
41
42 difficult (I. Fries et al., 2013). The use of PCR based techniques to detect and discriminate
43
44 between *N. apis* and *N. cerenae* overcome the low specificity of microscopy and have been
45
46 widely used for the detection, discrimination and diagnosis of nosemosis (Chen et al., 2009).
47
48
49
50
51
52

53
54 The results of our work indicate a wide spread of nosemosis in all the four geographical regions
55
56 included in the study with a marked dominion of *N. apis* as the more abundant of the two
57
58 *Nosema* species with a 86.84% prevalence over 21.06% prevalence of *N. cerenae* infection, with
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 the simultaneous presence of *N. cerenae* in a little over half of the apiaries tested for a 11.84%
5
6
7 coinfection prevalence. These results differed widely from previous studies for prevalence of
8
9
10 *Nosemiosis* in Mexico, reporting up to 100% of *N. cerenae* infection in a recent retrospective
11
12 study that originally suspected of *N. apis* as the dominant microsporidian responsible for
13
14 infection in Mexican apiaries. This study was based on *Nosema* identification using a PCR assay
15
16 and a set of primers very similar from those used here. The study report *N. cerenae* as the
17
18 dominant microsporidian infection apiaries and has been present in Mexico at least since 1995
19
20 (Guerrero-Molina et al., 2016). The results of our work however, are similar to those reported in
21
22 Sweden in a study that included 319 samples positive for microsporidia spores detected by
23
24 microscopy followed by confirmation of species using molecular detection techniques. The
25
26 results of this work showed 83% prevalence for *N. apis* and 17% prevalence of *N. apis* and *N.*
27
28 *cerenae* co-infection (I. Fries, and Forsgren, E., 2008). Several other non-published studies of
29
30 *Nosemiosis* in Mexico presented at honey and bee meetings, consistently report *N. cerenae* as
31
32 more prevalent than *N. apis*.
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Despite the knowledge of the presence of *Nosema spp.* infection in apiaries of the states of
42
43 Jalisco and Yucatán in Central and South Mexico since the 1960s, only a few studies has been
44
45 reported the presence and identification of *N. apis* and *N. cerenae* in the rest of the country, their
46
47 geographical distribution or basic epidemiological information of the disease in Mexico (Ernesto
48
49 Guzman-Novoa et al., 2011). This situation is originated mainly from the lack of a modern
50
51 diagnostic capacity, lack of technical information and education by beekeepers about health
52
53 problems affecting bees and the economic impact related to the presence of infectious diseases in
54
55 the apiaries (E. Guzman-Novoa, 2009; Ernesto Guzman-Novoa et al., 2011). The problems
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

associated with the management and control of infectious diseases in Mexico's beekeeping industry addresses the importance of the availability of modern diagnostic tools for accurate detection, identification and control of these diseases.

Besides the dominance of *N. apis* infection observed in our study for all the four regions conforming the Northwest corner of Mexico, it is important to mention that 49/76 of the apiaries tested positive for *N. apis* were located in the neighbor agricultural valleys of Mexicali (43/49 positive apiaries) and San Luis Rio Colorado (6/76 positive apiaries) with a cumulative prevalence of 64.47%. These two locations form a continuous agricultural valley divided by the Colorado River and grown multiple crops of grains, produce, forages and fruits, harboring and sustaining approximately 85% of the total apiaries of the region. The climate in this area is hot and dry with average high temperature of 31.2 °C (range 20.4 °C to 42.3 °C) and average low temperature of 14.9 °C (range 5.7 to 25.6) being July the hottest and December the coldest months of the year with an average rainfall of only 71 mm. Climate conditions are also an important variable to consider for the presence of either species of *Nosema* in the Northwest region of Mexico. In this regard, the results of our study are also completely opposite to several studies reporting a dominance of *N. cerenae* infections in regions with warmer climates and presence of *N. apis* at higher prevalence in regions with colder climates, especially North America and Europe (I. Fries, and Forsgren, E., 2008; Kibbe, 2007; Martin-Hernandez et al., 2007; Williams, Sampson, Shutler, & Rogers, 2008). The higher prevalence of *N. apis* detected in this warmer region of Mexico it is also a variable that require of further studies to be clarified.

1
2
3
4 Prevalence of Nosemiosis in honey bees may vary from one region to another and from season to
5
6 season. Despite *N. apis* has been reported worldwide, it is not considered a serious health
7
8 problem for bees in temperate climate regions. However, epidemiological studies of *Nosemiosis*
9
10 from different countries and continents indicate a clear dominion of *N. cerenae* over *N. apis*
11
12 prevalence in *Apis mellifera* populations (Ansari, Al-Ghamdi, Nuru, Khan, & Alattal, 2017).
13
14 Infection with *N. apis* and/or *N. cerenae* can be present in apiaries with no evident symptoms of
15
16 disease, leading to the decrease in colony size and honey production, affecting the profitability of
17
18 the bee industry (Milbrath et al., 2015). This situation is widely ignored or underestimated by
19
20 beekeepers in our region mainly because of the insufficient training in basic biosecurity
21
22 procedures for bee keeping. According to the available reports, during the last 5 years technical
23
24 assistance programs from state and federal agricultural offices covered only 39.5% of registered
25
26 beekeepers in the region (SEFOA, 2009). Recently, registered beekeepers from the four
27
28 geographical locations included in this study begin to get more involved in health and biosecurity
29
30 aspects related to the bee industry, being this the first report of prevalence and geographical
31
32 distribution of *N. apis* and *N. cerenae* in apiaries located in the Northwest corner of Mexico
33
34 which were used to propose several disease control measurements for the improvement of bee
35
36 industry of this region, including technical assistance and basic biosecurity strategies to
37
38 beekeepers. Finally, it is imperative to conduct more detailed epidemiological studies in order to
39
40 estimate the risk factors associated with the presence of *N. apis* and *N. cerenae* and their impact
41
42 in the economic aspects of the activity.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Conclusion 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

The duplex Eva Green real-time PCR assay presented here is highly specific and sensitive for the detection of *N. apis* and *N. ceranae* and could provide a rapid and accurate diagnostic tool for the simultaneous detection and discrimination of both microsporidians. The assay can be useful not only for clinical diagnostics and disease surveillance but also to evaluate the effectiveness of the measurements for control and prevention of Nosemiosis in our region.

References

- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Khan, K. A., & Alattal, Y. (2017). Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 983-991.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D., & Danka, R. G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 53-58.
- Burgher-MacLellan, K. L., Williams, G. R., Shutler, D., MacKenzie, K., & Rogers, R. E. L. (2010). Optimization of Duplex Real-Time PCR with Meltingcurve Analysis for Detecting the Microsporidian Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *The Canadian Entomologist*, 142(3), 271-283.
- Charbonneau, L. R., Hillier, N. K., Rogers, R. E. L., Williams, G. R., & Shutler, D. (2015). Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports*, 6, 22626.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., et al. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 204-209.

1
2
3
4 Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J.-H., et al. (2012). Gut Pathology
5 and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(5),
6
7 e37017.
8
9
10
11 Fries, I., and Forsgren, E. (2008). Investigation of the distribution of *Nosema ceranae* in Sweden
12
13 *Bitidningen*, 107, 2.
14
15
16 Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., et al. (2013). Standard methods
17
18 for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.
19
20
21 Guerrero-Molina, C., Correa-Benitez, A., Hamiduzzaman, M. M., & Guzman-Novoa, E. (2016). *Nosema*
22
23 *ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico, causing infection levels of
24
25 one million spores per bee or higher during summer and fall. *J Invertebr Pathol*, 141, 38-40.
26
27
28 Guzman-Novoa, E. (2009). Que tan grave es la Nosemosis de abejas en Mexico. *Apicultura*, 74(74), 5.
29
30
31 Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavaleta-Velasco, M. E., Koleoglu, G. n., Valizadeh, P., &
32
33 Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*,
34
35 35(suppl_2), W43-W46.
36
37
38 Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailan, E., & Higes, M. (2007).
39
40 Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*,
41
42 73(20), 6331-6338.
43
44
45 Milbrath, M. O., van Tran, T., Huang, W.-F., Solter, L. F., Tarpy, D. R., Lawrence, F., et al. (2015).
46
47 Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis*
48
49 *mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 9-15.
50
51
52 Paxton, R. J. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey
53
54 bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 80-84.
55
56
57 SEFOA, S. d. F. A. d. B. C. (2009). Estudio Apícola en Baja California.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D., & Rogers, R. E. L. (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 342-344.

Capítulo 4

IV CONCLUSIÓN GENERAL

Con base en lo anterior, se concluye que las pruebas de rutina para diagnóstico serológico para leptospirosis disponibles en la actualidad, si bien son suficientes para detectar animales infectados, presentan numerosas desventajas y complicaciones, dentro de las cuales se encuentran costos y riesgo. Sin embargo si existe la disponibilidad de herramientas de escrutinio serológico con tecnología capaz de diferenciar animales con leptospirosis de aquellos infectados con otros organismos.

Se recomienda la exploración de alternativas de diagnóstico distintas a las que utilizan los antígenos de células completas. Y se propone ELISA indirecto de rLipL32 como una alternativa viable para el diagnóstico serológico. Se requieren estudios adicionales para la validación clínica en muestras de campo bajo diferentes escenarios epidemiológicos.