

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

DESARROLLO DEL PCR REP1 PARA DIFERENCIAR SEROVARES DE *LEPTOSPIRA* SP Y COMPARACIÓN CON LA PRUEBA INMUNOLÓGICA MAT (ENSAYO MICROSCÓPICO DE AGLUTINACIÓN)

Development of PCR Rep1 to Differentiate Serovars of *Leptospira* sp and Comparison with the Immunological Test MAT (Microscopic Agglutination Test)

Jesús Rojas Jaimes ¹, Manuel Céspedes Zambrano ²

RESUMEN

Objetivo: desarrollar una prueba para diferenciar a nivel molecular los serovares de *Leptospira* sp.

Materiales y método: se estandarizaron las condiciones de PCR-Rep1 usando 25 serovares referenciales del laboratorio de zoonosis bacterianas; se desarrolló la sensibilidad de la prueba frente al método referencial "Técnica de microaglutinación" (MAT), la repetibilidad y la especificidad.

Resultados: las condiciones óptimas para el PCR Rep1 fueron: temperatura de hibridación: 49,1°C. Cloruro de Magnesio: 3mM. Enzima: 2,5 Unidades, 200uM dNTPs, 2uM Primer y 100 ng de ADN para un volumen final de 50 ul. El PCR Rep1 optimizado permitió diferenciar serovares de relevancia epidemiológica como: mankarso, icterohaemorrhagiae, cynoptery, pomona, pyrogenes, tarassovi, autummalis, bataviae canicola y wolffi de *L. interrogans*; ballum y javanica de *L. borgpetersenii*; así como diferenciar entre las especies *L. weilii*, *L. kirscheni*, *L. santarosae*, *L. alexanderi*, *L. biflexa* y *L. noguchi*, mientras que algunos serovares no pudieron ser diferenciados.

Conclusión: el PCR-Rep1 provee un método rápido y poco costoso comparado a otras pruebas moleculares y serológicas para la identificación de serovares de *Leptospira* sp.

Palabras clave: zoonosis bacteriana, leptospirosis, serovar, PCR Rep.

ABSTRACT

Objective: To develop a test of Rep1 PCR to differentiate, at a molecular level, serovars in *Leptospira* sp.

Material and method: To develop the standardization of PCR Rep 1 using 25 reference serovars from the bacterial zoonoses laboratory; to make the sensitivity of the test against the reference test "Test of microagglutination", the reproducibility and specificity of the Rep 1 PCR.

Results: the best conditions for Rep1 PCR were for temperature of hybridization 49.1°C, 3mM Mg, 2,5 U Enzyme, 200uM dNTPs, 2uM Primer and 100ng DNA in a final volume of 50 ul of reaction. The Rep1 PCR could differentiate between serovars of epidemiologic relevance: mankarso, icterohaemorrhagiae, cynoptery, pomona, pyrogenes, tarassovi, autummalis, bataviae canicola and wolffi (*L. interrogans*), ballum and javanica (*L. borgpetersenii*), *L. weilii*, *L. kirscheni*, *L. santarosae*, *L. alexanderi*, *L. biflexa* y *L. noguchi*.

Conclusion: The Rep1 PCR provides a fast and less expensive method compared to other molecular and serologic methods for classifying serovars in *Leptospira* sp.

Key words: Bacteria zoonotic, leptospirosis, serovar, Rep PCR.

INTRODUCCIÓN

La "Leptospirosis" es una de las zoonosis bacterianas más ampliamente distribuida a nivel mundial y de mucha importancia en salud pública; es causada por una espiroqueta patógena del género *Leptospira*, presente en una gran variedad de mamíferos que actúan como

reservorios, algunos de importancia en las zonas rurales y la ciudad; por ejemplo, en ganado vacuno, porcino, caprino, canes, marsupiales y roedores, los cuales presentan una alta probabilidad de transmitir la enfermedad al ser humano ¹. La definición de serovar fue formulada por primera vez en 1954 por Wolff y Broom, y no fue únicamente por clasificación sistémica, sino para su aplicación práctica y la descripción de la relación entre hospedero-parásito. La clasificación actual utiliza lo que estos dos autores dejaron planteado acerca de la determinación de los serogrupos y serovares ². En la actualidad existen técnicas como el MAT (prueba

¹ Licenciado en Biología. Instituto Nacional de Salud-Laboratorio de zoonosis bacterianas-Lima, Perú

² Licenciado en Biología. Instituto Nacional de Salud-Laboratorio de zoonosis bacterianas-Lima, Perú

de microaglutinación) para la tipificación de *Leptospira* sp. y que es usado como el método de referencia, para el cual se necesita de una batería antigénica en constante mantenimiento, lo cual implica un riesgo en el manejo de la misma; además, el uso de MAT está confinado a pocos laboratorios referenciales por la infraestructura necesaria. Otra técnica de amplio uso es la prueba de ELISA, de mucha ayuda como prueba tamiz, pero que carece de la capacidad de caracterizar serovares de *Leptospira* sp. Es importante mencionar que tanto MAT como ELISA, por ser pruebas serológicas, requieren un tiempo mínimo de siete días para la formación de anticuerpos; esta es su principal desventaja para emplearlas durante un diagnóstico temprano (casos agudos) en el que el tiempo de identificación del agente etiológico es importante³. El uso de pruebas moleculares resuelve el factor tiempo, además de presentar en algunos casos mayor especificidad y sensibilidad en comparación con las pruebas serológicas⁴. Las pruebas moleculares para identificación de *Leptospira* sp. son relativamente modernas, y aún se precisa más estudios sobre su efectividad y utilidad. Entre las más utilizadas tenemos: marcado con sondas de ADN, hibridación de ARN con marcaje radioactivo y PCR con mayor efectividad en muestras de orina⁵. La importancia de diferenciar entre los numerosos serovares de *Leptospira* ha llevado a muchos investigadores a ensayar múltiples métodos moleculares. Zuerner⁶ en 1997 propuso una diferenciación al comparar un método de hibridación (Southern Blot) con un ensayo de PCR. Sin embargo, existen algunas desventajas en ciertas técnicas moleculares; por ejemplo, en el uso de pruebas moleculares como RFLP, PCR-IS1500 (secuencia de inserción) y los RAPD: el alto costo (RFLP), la incapacidad para discriminar a nivel de serovares (IS 1500); así como, en los RAPD, la falta de reproducibilidad^{7,8}. En tal sentido, la prueba de PCR Rep1 PCR se presenta como una alternativa a los métodos moleculares actuales, ya que entre sus ventajas están su costo semejante al de una prueba de PCR convencional, la utilización de un solo primer, la capacidad de discriminar entre serovares a través de un patrón de bandas, presentándose como una alternativa complementaria a la tipificación serológica y la utilización de antisueros.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Cultivo de cepas de *Leptospira* sp. y extracción de DNA, usando el Kit Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN); se trabajó con parte del cepario del Laboratorio de

Zoonosis Bacteriana del Instituto Nacional de Salud, con cepas referenciales utilizadas para tipificación y en el MAT, además de aislamientos provenientes de diferentes regiones del país (Perú). Se realizó un pasaje de las cepas tomando 1ml de un cultivo conservado por 30 días y se inoculó en 5ml de medio EMJH (Medio Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris), y se incubaron a 28°C por aproximadamente ocho días hasta que alcanzaron una densidad celular de 10⁸ células /ml medido por espectrofotometría a 420 nm.

2.-Condiciones del PCR - Rep1:
temperatura de hibridación: 50°C Cloruro de Magnesio: 3mM, Enzima: 2,5 Unidades 100ng de ADN para un volumen final: 50 ul.

3.-Tipificación de serovares por MAT: se realizó una prueba de microaglutinación para confirmar la identidad de los serovares utilizados en el PCR Rep1. Los cultivos obtenidos fueron enfrentados con su respectivo antisuero en diluciones dobles sucesivas, comenzando en 1/100 hasta 1/102400.

4.-Sensibilidad de la prueba: la sensibilidad de la prueba se evaluó con la fórmula: $[(PA/N+) \times 100]$ (Sachse,2003) Donde: PA = Resultados positivos obtenidos por el PCR Rep1. N+ = Número de muestras positivas con el método de referencia.

RESULTADOS

Tipificación de serovares por MAT: se realizó una prueba de microaglutinación para confirmar la identidad de los serovares utilizados en el PCR REP1. Los cultivos obtenidos fueron enfrentados con su respectivo antisuero en diluciones dobles sucesivas, desde 1/100 hasta 1/102400. La tabla 1 muestra que todos los serovares reaccionaron con su respectivo antisuero en títulos mayores a 1/6400; excepto javanica y hardjo, que reaccionaron a 1/3200. Los serovares cynopteri y varillal necesitaron mayor dilución después del título 1/51200, lo que corrobora la alta seroreactividad del serovar varillal.

Tabla 1:
Titulación mediante absorción cruzada para tipificación de los serovares utilizados en el ensayo

Serovar	Diluciones										
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
Australis	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	
autummalis	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	
Balum	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+			
Bataviae	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	
Canicola	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+		
Celledoni	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	
Cynoptery	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Djasiman	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+
Grippotyphosa	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	
Icterohaemorrhagiae	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+		
Javanica	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+		
Georgia	4+	4+	4+	4+	4+	2+	1+				
Pomona	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	2+	2+	2+
Pyrogenes	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+				
Wolfii	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+			
Tarassovi	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+			
Bratislava	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	
Borincana	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+		
copenhageni	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+			
Hardjo	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+				
Var-100	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Patoc(Serogrupo)	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+
Panama	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	1+	1+	1+

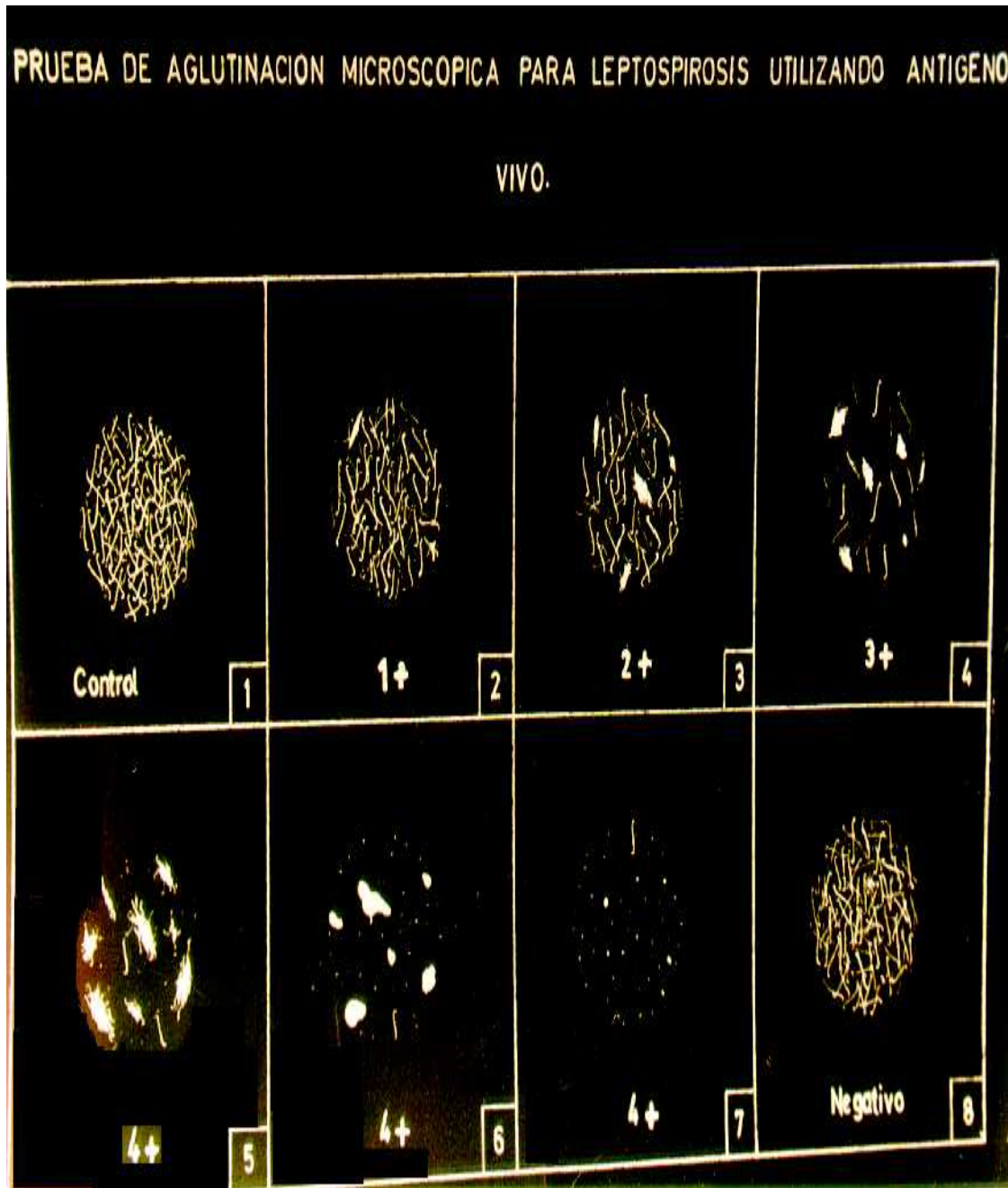


Figura 1.-Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

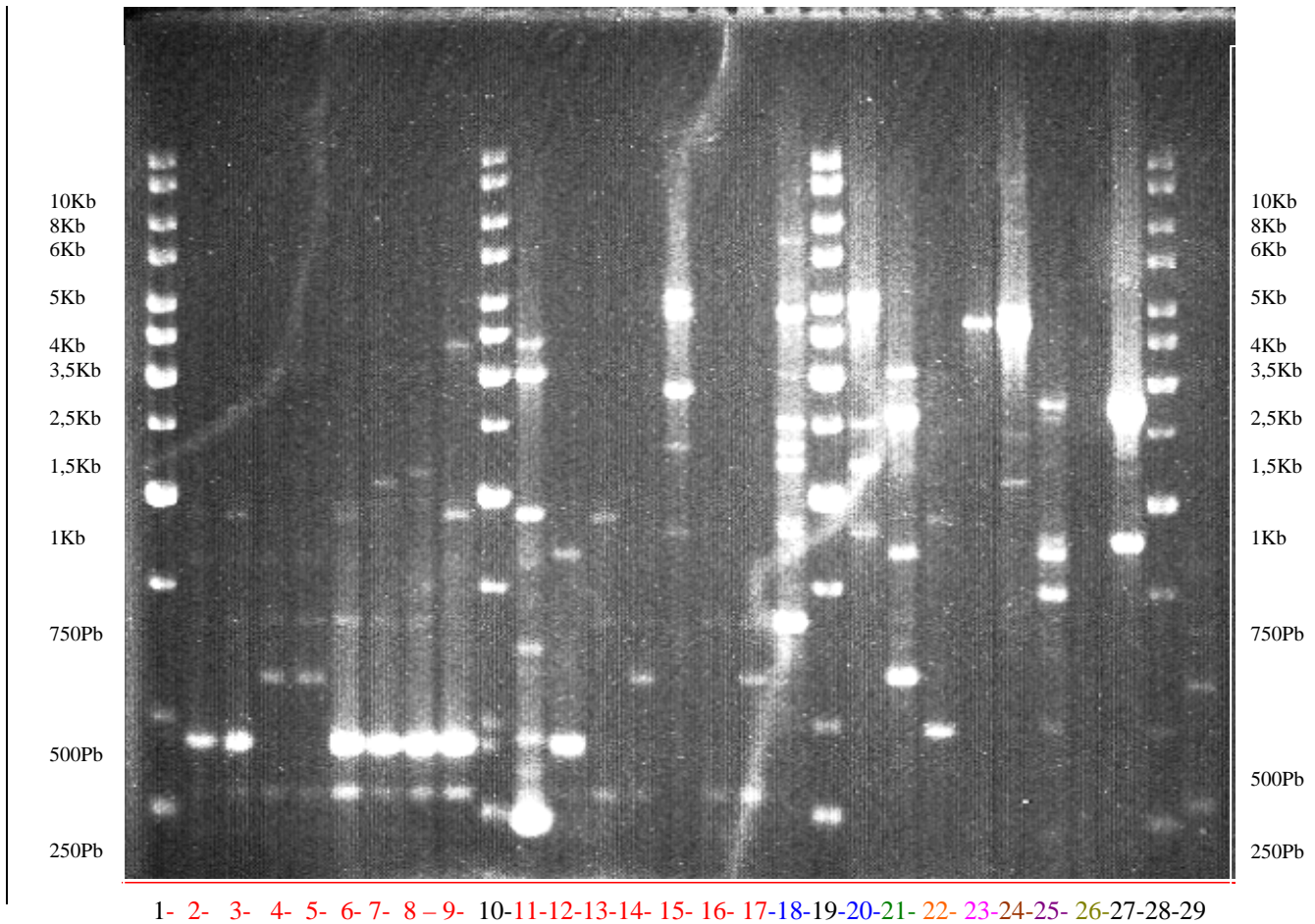


Fig 2.-Estandarización del PCR Rep1.-Las muestras fueron corridas en agarosa Nusive al 1,5%.

Celda 1: marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder Fermentas, 2 sv australis, 3 sv bratislava, 4 sv icterohaemorrhagiae, 5c sv copenhageni, 6 sv mankarso, 7 sv autummalis, 8 sv bataviae, 9 sv canicola, 10 Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder Fermentas , 11 sv cynoptei, 12 sv pomona, 13 sv pyrogenes, 14 sv djasiman, 15 sv tarassovi,16 sv wolffi, 17 sv hardjo,18 sv ballum,19 Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder Fermentas, 20 sv javanica,21 sv celledoni, 22 sv grippotyphosa, 23 sv georgia, 24 sv borincana, 25 Patoc, 26 panama, 27 sv varillal, 28 Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder Fermentas, celda 29: control.

Obtención del patrón de bandas de las cepas referenciales con el PCR Rep1

Las cepas referenciales de *Leptospira* sp. utilizadas para la prueba del MAT en el Laboratorio de Zoonosis Bacteriana sirvieron de patrón para la aplicación del PCR-Rep1. La figura 1 muestra el patrón de bandas obtenido:

a) Todos los serovares de *L.interrogans* presentaron una banda especie específica de aproximadamente 400pb a excepción de los serovares icterohaemorrhagiae y copenhageni (carril 4 y 5), los cuales eran prácticamente indiferenciables. Se observó que el serovar tarassovi difería totalmente de los demás serovares que se encuentran en esta especie, teniendo mayor similitud con el serovar javanica (*L.borgpetersenii*) debido a las bandas a 800, 1250, 1800, 2900 y 3000pb. Los serovares (australis, bratislava y mankarso) mostraron patrones de bandas **similares de "400,900pb"**, y no pudieron ser diferenciados; también los serovares (icterohaemorrhagiae, copenhageni, hardjo y djansiman) mostraron patrones **similares entre ellos de "300 y 600"** y no pudieron ser diferenciados. Sin embargo, existió una diferencia clara entre los serovares (mankarso, icterohaemorrhagiae, cynoptery, pomona, pyrogenes, tarassovi, autummalis, bataviae, canicola y wolffi).

b.) *L.borgpetersenii*.- Se observó una diferencia clara dentro de los serovares ballum (700, 850, 900, 1350, 1400, 1500, 3000, 4000 y 5500pb) y javanica (850, 1350, 1500 y 4000 pb) en esta especie.

c.) Los serovares de las demás especies en estudio, *L. weilii* (sv celledoni 600, 875, 1600 y 2000pb), *L.kirscheni* (sv grippotyphosa 400 y 1200pb), *L.santarosae* (sv georgia 2725pb), *L.alexanderi* (sv borincana 1100 y 3000pb), *L.biflexa* (Patoc 700, 875 y 1725pb) y mostraron diferentes patrones de bandas interespecies.

Sensibilidad del PCR REP1.-La sensibilidad se evaluó por la siguiente fórmula:

$$[(PA/N+) \times 100] \text{ (Sachse, 2003)}$$

Donde:

PA: El número de resultados positivos obtenidos por el PCR Rep1

N+: Es el número de muestras positivas con el método referencial (MAT).

Para nuestro ensayo se obtuvieron 16 serovares diferenciados por el PCR Rep1 frente a las 23 cepas referenciales tipificadas por MAT, con lo que se obtuvo un 69% de sensibilidad para el ensayo.

DISCUSIÓN

En el desarrollo para evaluar diferenciación de serovares por el PCR Rep 1, no se observó una total diferenciación entre serovares; por ejemplo, en la especie *L. interrogans* existió similitud entre los serovares (australis, bratislava y mankarso) en las bandas de 400 y 900pb; así el serovar tarassovi difirió totalmente de los demás serovares que se encuentran en esta especie y tuvo mayor similitud con el serovar javanica (*L.borgpetersenii*) debido a las bandas a 800, 1250, 1800, 2900 y 3000pb. También los serovares (icterohaemorrhagiae, copenhageni, hardjo y djaniman) mostraron patrones similares entre ellos de "300 y 600," y no pudieron ser diferenciados.

En *L.borgpetersenii* se observó una diferencia clara dentro de los serovares (ballum y javanica) en esta especie; así los serovares de las demás especies en estudio, *L. weilii* (600, 875, 1600 y 2000 b), *L.kirscheni* (400 y 1200pb), *L.santarosae* (2725pb), *L.alexanderi* (1100 y 3000pb), *L.biflexa* (700, 875 y 1725pb) y *L.noguchi* (825 y 1725pb) mostraron diferentes patrones de bandas inter especies. En el presente trabajo se pudo corroborar lo observado por Barocchi ³, respecto a que los serovares icterohaemorrhagiae, copenhageni mostraron similares bandas. Otras pruebas moleculares se realizaron para poder diferenciar serovares del género *Leptospira*; ejemplo de ello son PCR IS 1500, IS 1533(8-9), PCR VNTR (número de repeticiones variables dispuestos en Tamden) ⁹, RAPD (amplificación de ADN polimórfico al azar) ⁹; en contraste, el ahorro de tiempo y dinero por el empleo del PCR Rep1 en el que se usó un solo primer coloca a esta técnica con ventaja frente a las pruebas moleculares mencionadas anteriormente. El PCR Rep1 logró la diferenciación entre los serovares de mayor importancia epidemiológica como: mankarso, icterohaemorrhagiae, cynoptery, pomona, pyrogenes, tarassovi, autummalis, bataviae, canicola y wolffi (*L.interrogans*), javanica y ballum (*L.borgpetersenii*), *L. weilii*, *L.kirscheni*, *L.santarosae*, *L.alexanderi*, *L.biflexa* y *L.noguchi* (Fig 1). La importancia del presente PCR-Rep1 deriva de que características clínicas y epidemiológicas son usualmente asociadas a serovares y serogrupos de *Leptospira* ¹⁰. Por lo tanto, se concluye que el PCR Rep1 1 logró la diferenciación entre los serovares de importancia epidemiológica como: mankarso, icterohaemorrhagiae, cynoptery, pomona, pyrogenes, tarassovi, autummalis, bataviae, canicola y wolffi (*L.interrogans*), ballum y javanica (*L.borgpetersenii*), *L. weilii*, *L.kirscheni*, *L.santarosae*, *L.alexanderi*, *L.biflexa* y

L.noguch, y se obtuvo una sensibilidad del 69% respecto al método referencial MAT.

Este trabajo ayudará así a discriminar los posibles reservorios para el género *Leptospira*; por ejemplo, se conoce que los serovares icterohaemorrhagiae y copenhageni están asociados a ratas domésticas, canicola al perro, pomona a cerdos y *Leptospira biflexa* saprofitas. Este conocimiento es de vital importancia en el control de un brote.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Céspedes M, Ormaechi M, Condori P, Balda L, Glenn M. Prevalencia de Leptospirosis y Factores de Riesgo en Personas con Antecedentes de Fiebre en la Provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental de Salud Pública, 2003. 20(4).
2. Hartskeerl, R., Smith, H., Korver, H., Goris, M. and Terstra, W. International Course on Laboratory Methods for Diagnosis of Leptospirosis. Amsterdam: Royal Institute; 2000.
- 3.- Barocchi M A., Ko Albert I, Ramos S, Tucunduva M, Galvao Metermayer. Identification of New Repetitive Element in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Its Application to PCR-Based Differentiation of *Leptospira* Serogroups. Journal of Clinical Microbiology, 2001: 191-195.
- 4.- Levett, P. N. Leptospirosis. Clinical Microbiology, 2001: 296-326.

5.- Zuerner R L, Alt D , Bolin C A. IS 1533-Based PCR Assay for Identification of *Leptospira interrogans* Sensu Lato Serovars. Journal of Clinical Microbiology, 1995: 3284-3289.

6.- Zuerner Richard L, Bolin Carole A. Differentiation of *Leptospira interrogans* Isolates by IS 1500 Hybridization and PCR Assays. Journal of Clinical Microbiology 1997: 2612-2617.

7.- Baranton G, I.G.Old. The Spirochetes: A different way of life. Bull Institute Pasteur 1995, 93: 63-95

8.- Corney B. G., Colley J, Graham C. G. Simplified analysis of pathogenic Leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Journal Medical Microbiology, 1997: 927-932.

9- Ramadass P, Meerarani S, Venkatesha M, Senthilkumar A, Nachimuthu K. Characterization of Leptospiral Serovars by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997:575-576.

10. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeu M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. Journal of Clinical Microbiology, 2005: 539-545.

Correspondencia electrónica: fago200179@yahoo.es

Fecha de recepción del artículo: 04/10/08

Fecha de aceptación del artículo: 10/11/08