

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos

Lic. Berta Victoria,<sup>1</sup> Dra. Carmen Fernández,<sup>2</sup> Téc. José E. Rodríguez,<sup>3</sup> Lic. Ana M. Obregón<sup>4</sup> y Lic. Islay Rodríguez<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron 18 cepas de *Leptospira*, aisladas de pacientes con leptospirosis humana de 3 provincias de Cuba, empleando métodos serológicos y genéticos. Las cepas fueron agrupadas por aglutinación microscópica (MAT), con 8 antisueros policlonales. Se utilizaron 9 anticuerpos monoclonales (AcMs) para determinar el serovar de las cepas. Alternativamente se realizó la extracción del ADN de estas cepas y fue amplificado por un sistema de reacción en cadena de la polimerasa descrito para leptospirosis patógenas. El ADN amplificado fue digerido con las enzimas de restricción Alu I y Hae III. Por MAT las cepas fueron agrupadas entre los serogrupos Ballum, Pomoma, Canicola e Icterohaemorrhagiae. Se determinó el serovar de 7 de las cepas estudiadas con el uso de los AcMs. Para la totalidad de las cepas se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa un fragmento amplificado de 631 pb. El análisis con enzimas de restricción del producto amplificado, originó iguales patrones de restricción en todas las cepas estudiadas. Los métodos utilizados permitieron la identificación a diferentes niveles de todas las cepas estudiadas, se señala que el uso de los AcMs hizo posible tipificar hasta serovar a 7 de las cepas.

**DeCS:** LEPTOSPIRA/aislamiento & purificación; LEPTOSPIRA/crecimiento & desarrollo; TESTS SEROLOGICOS; LEPTOSPIROSIS/diagnóstico; LEPTOSPIROSIS/prevenición & control; TESTS DE AGLUTINACION.

Entre las actividades que debe realizar un Laboratorio de Referencia de *Leptospira* está identificar y verificar cepas de *Leptospira* aisladas de pacientes o ambientales,<sup>1</sup> esta identificación puede realizarse con la utilización de varias técnicas y cada laboratorio de referencia puede usar una combinación diferente de pruebas, en dependencia de la disponibilidad de reactivos y la experiencia que tenga con los diferentes métodos. Frecuentemente se usa una combinación de métodos serológicos y genéticos.<sup>2</sup> La primera prioridad es determinar si el aislamiento es una leptospira patógena o saprófita. Esto puede hacerse fenotípicamente basado en el crecimiento a 13°C,

o en presencia de 8-azaguanina ó 5-fluorouracilo, o CuSO<sub>4</sub>,<sup>1</sup> por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) con la utilización de cebadores para leptospirosis patógenas,<sup>3,4</sup> o por inoculación en animales.

En Cuba, la existencia de un clima tropical, con regímenes lluviosos en determinadas épocas del año, los diferentes fluviales naturales y artificiales, las extensas áreas agrícolas, han favorecido la propagación de la leptospirosis.<sup>5</sup>

Teniendo en cuenta la importancia concedida a la identificación de los aislamientos de *Leptospira* en el perfeccionamiento de los sistemas de diagnóstico, en la Epidemiología, así como en la

<sup>1</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Máster en Ciencias. Doctora en Medicina Veterinaria. Investigadora Auxiliar. IPK.

<sup>3</sup> Técnico en Microbiología. IPK.

<sup>4</sup> Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. IPK.

<sup>5</sup> Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. IPK.

preparación de vacunas eficaces para el control de esta enfermedad; en el presente estudio los autores se propusieron identificar cepas de *Leptospira* con la utilización de una combinación de técnicas serológicas y genéticas.

## MÉTODOS

Se estudiaron 18 cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana de 3 provincias de Cuba, recepcionadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospira* (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK): 10 cepas de Villa Clara (período 1998-1999), 7 cepas de Holguín (período 2000-2001) y 1 cepa de Las Tunas (del año 2001). Además se utilizaron 6 cepas de referencia (4 patógenas y 2 no patógenas) de la colección del Laboratorio de Referencia de Leptospirosis, Instituto de Medicina Tropical de Holanda (KIT). Estas fueron conservadas en medio Fletcher, en el LNRL del IPK. Cada cepa fue cultivada en medio de cultivo EMJH, incubada de 28 a 30 °C y observada al microscopio de campo oscuro hasta una concentración aproximada de  $1-7 \times 10^8$  células/mL.<sup>1</sup>

Las 18 cepas fueron seroagrupadas por la técnica de aglutinación microscópica (MAT, siglas en inglés) enfrentándolas a una batería de antisueros policlonales pertenecientes a 8 serogrupos de referencia<sup>1</sup> y después fueron enfrentadas a varios anticuerpos monoclonales (AcMs), (comercialmente disponibles en el KIT) en correspondencia al serogrupo en el que había sido ubicada cada cepa: Ballum/ F74C1-7, F74C7, Pomona/ F58C2-3, F43C9-5, F46C1-4, Canicola/ F152C11-3, F152C8, Icterohaemorrhagiae/ F70C14-7, F70C24. La reactividad antigénica obtenida fue comparada con los patrones de antigenicidad característicos.<sup>6,7</sup> Alternativamente, a partir de 1 mL de cada cultivo de las cepas se realizó la extracción del ADN por calentamiento a 100 °C x 10 min y rápido enfriamiento en hielo.<sup>8</sup> Un volumen de 5 mL de cada lisado celular fue sometido al sistema de PCR descrito por Hookey en 1992, que permite amplificar un fragmento de 631 pb del gen 16 S del ADN ribosomal. La mezcla de reacción contenía tampón II 1x (Perkin E.), dNTP (200 µM) (Promega), cebadores L1 y L2

(1µM) (Eurogentec), Enzima Taq polimerasa (2.5 U) (Amplicon) y agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 50 µL.

Se tomó una muestra (10 mL) del producto de PCR y fue analizada por electroforesis submarina en gel de agarosa 2 % en tampón TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 80 V durante 2 h. En el gel se aplicó el marcador de peso molecular Ø174 RF DNA/Hae III Fragments (Gibco BRL). El gel fue visualizado con luz ultravioleta y fotografiado. Se hizo un análisis de los sitios de restricción en el fragmento amplificado (con la utilización de la secuencia de bases descrita<sup>9</sup> para el gen 16S del ARN ribosomal de *Leptospira interrogans*, GI=“44008”, GenBank) mediante el programa computadorizado Gene Runner, para determinar las endonucleasas de restricción con sitios de corte en el fragmento y que originan patrones de restricción con buena resolución; de estas se utilizaron las disponibles en el laboratorio. Entonces el ADN amplificado fue sometido a digestión enzimática con las endonucleasas seleccionadas, en un volumen final de 30 mL. La mezcla preparada para la digestión se incubó a 37 °C en un baño termostático durante 2 h. El producto de la digestión (30 mL) fue analizado por electroforesis submarina bajo las mismas condiciones antes descritas.

## RESULTADOS

Como resultado del análisis por la técnica de MAT todas las cepas fueron agrupadas entre los serogrupos Ballum, Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae (tabla). Los resultados del tipaje con AcMs se muestran en la tabla. Las cepas 282, 403, 670, 960, 1 012, 1 015 y 91 fueron identificadas hasta serovar. Para las cepas 329, 721, 591, 675, 229, 180 y 917, pertenecientes al serogrupo Ballum, queda por definir el serovar entre los citados en la tabla (se descartaron otros serovares). Las cepas 570, 117, 19 y 1 048 no reaccionaron con los AcMs a los que se enfrentaron. Se obtuvo un producto de amplificación de 631 pb en todas las cepas estudiadas, así como en las cepas patógenas de referencia utilizadas (fig.). No hubo amplificación en las cepas no patógenas de referencia. A través

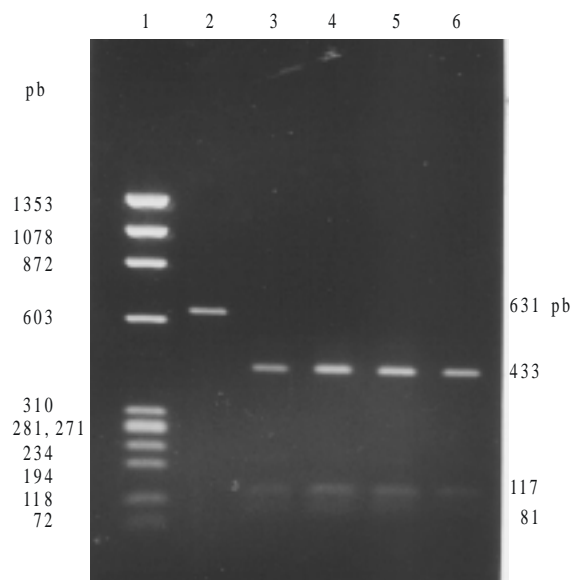
TABLA. Resultados de la identificación serológica de las cepas

No.	Cepa	Provincia	MAT (serogrupo)	AcMs (serovar)
1	329	Villa Clara	Ballum	castelloni, arborea, quangdong
2	721	Villa Clara	Ballum	castelloni, arborea, quangdong
3	591	Villa Clara	Ballum	castelloni, arborea, quangdong
4	675	Villa Clara	Ballum	castelloni, arborea, ballum, quangdong
5	229	Villa Clara	Ballum	castelloni, arborea, ballum, quangdong
6	282	Villa Clara	Ballum	ballum
7	403	Villa Clara	Icterohaemorrhagiae	copenhageni
8	570	Villa Clara	Pomona	-
9	117	Villa Clara	Pomona	-
10	670	Villa Clara	Pomona	proechimis
11	19	Holguín	Canicola	-
12	180	Holguín	Ballum	castelloni, arborea, quangdong
13	917	Holguín	Ballum	castelloni, arborea, quangdong
14	960	Holguín	Pomona	pomona
15	1 012	Holguín	Canicola	canicola
16	1 015	Holguín	Canicola	canicola
17	1 048	Holguín	Canicola	-
18	91	Las Tunas	Pomona	mozdok

(-) no reacción.

del programa computadorizado se encontraron 46 enzimas que cortan el fragmento analizado entre 2 y 3 veces, de estas, 20 originan fragmentos que de acuerdo con su talla podrían ser separados electroforéticamente con buena resolución. Las enzimas seleccionadas para realizar la digestión

enzimática fueron Alu I con la cual se obtuvieron fragmentos de 81, 117 y 433 pb (fig.) y Hae III que originó fragmentos de 245 y 370 pb (datos no mostrados). Los patrones de restricción originados por ambas digestiones enzimáticas fueron los mismos en todas las cepas, incluidas las cepas patógenas de referencia utilizadas.



Línea 1: Patrón de peso molecular Ø174 RF DNA/Hae III Fragments; línea 2: Producto de PCR, cepa de referencia Ballum ballum Mus 127; líneas 3-6: Productos del análisis de restricción, 3: cepa de referencia Ballum ballum Mus 127, 4: cepa 282, 5: cepa 329, 6: cepa 591.

Fig. Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Resultados representativos de PCR y análisis de restricción del fragmento amplificado en la enzima AluI.

## DISCUSIÓN

Los serogrupos encontrados en estas cepas coinciden con los más frecuentemente identificados por MAT en cepas aisladas de estas regiones, según estudios antes realizados en el laboratorio (Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez JE, Fernández C, y Victoria B, datos no publicados). En las cepas del serogrupo Ballum para las cuales queda por precisar el serovar, entre los descritos en la tabla, se debe señalar que los AcMs contra *Leptospira* reaccionan contra epitopes comunes y otros específicos a la cepa contra la cual se produjeron, por lo que presentan muchas reacciones cruzadas y en algunas cepas es preciso el uso de un panel completo de AcMs para definir el serovar.<sup>2</sup> Las cepas que no reaccionaron con los AcMs contra los que se enfrentaron también requieren ser tipadas con la utilización de otros AcMs.

Los resultados en el PCR coincidieron con los obtenidos por Hookey en 1992, al utilizar este sistema, descrito para leptospiras patógenas.

Al observar que no se obtuvieron diferencias en los patrones de restricción entre las diferentes cepas, se puede decir que los sitios de corte de las enzimas utilizadas están relacionados con regiones conservadas de este gen. Savio y otros, en 1994, lograron discriminar entre diferentes serovares de *Leptospira interrogans*, a partir del estudio con endonucleasas de restricción de un fragmento amplificado de 570 pb. Estos autores probaron un mayor número de enzimas de restricción, por lo que sería conveniente continuar buscando la diferenciación genética de las cepas de este estudio con la utilización de otras endonucleasas de restricción entre las seleccionadas por el programa computadorizado.

Las técnicas serológicas y genéticas aplicadas permitieron la identificación a diferentes niveles de todas las cepas estudiadas. El uso de los AcMs hizo posible identificar 7 de las cepas estudiadas hasta serovar.

#### SUMMARY

Serological and genetic methods were used to study 18 leptospiral strains isolated from patients with leptospirosis in 3 Cuban provinces. The strains were grouped by microscopic agglutination with 8 polyclonal antisera. Nine monoclonal antibodies served to determine the strain serovars. Alternatively, DNA was extracted from these strains and applied by a polymerase chain reaction system described for pathogenic leptospiras. Amplified DNA was digested by restriction enzymes Alu I and Hae III. MAT grouped the strains among serogroups Ballum, Ponom, Canicula and Icterohaemorrhagiae. Monoclonal antibodies determined the serovars of seven of the studied strains. For all the strains, an amplified fragment of 631 pb was obtained by polymerase chain reaction. The analysis of the amplified product

with restriction enzymes revealed similar patterns of restriction in all the strains. The used methods made it possible to identify all the strains at different levels. It is also pointed out that the use of monoclonal antibodies allowed to typify seven strains up to the serovar level.

**Subject headings:** LEPTOSPIRA/isolation & purifications; LEPTOSPIRA/growth and development; SEROLOGIC TESTS; LEPTOSPIROSIS/diagnosis; LEPTOSPIROSIS /prevention & control; AGGLUTINATION TESTS.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO; 1982. (Scientific publication No 67).
2. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and Leptospirosis, 2<sup>nd</sup> ed. 1999. Med. Sci, Melbourne, Australia.
3. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. J General Microbiol 1993; 139:1691-700.
4. Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S DNA ribosomal. FEMS Microbiol 1992; 90:267-74.
5. Dotres C. La salud pública en Cuba. Hechos y Cifras. 1999. Dirección Nacional de Estadística. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba.
6. Korver H, Kolk AHJ, Vingerhoed J, Leeuwen J van, Terpstra WJ. Classification of serovars of the Icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibodies. Isr J Vet Med 1988; 44:15-8.
7. Terpstra WJ, Korver H, Leeuwen J van, Klatser PR, Kolk AHJ. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. Zbl Bact Hyg A 1985; 259, 498-506.
8. Welsh J, Mc Clelland. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990;18:7213-8.
9. Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini LM. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Clin Microbiol 1994;32(4):935-41.

Recibido: 17 de septiembre de 2001. Aprobado: 18 de diciembre de 2001.

Lic. *Berta Victoria*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: berta@ipk.sld.cu