

INSTITUTO DE MEDINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Método de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección temprana de *Leptospira* spp. en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis

Lic. Yarelys Zamora,¹ Dra Carmen Fernández,² Lic. Islay Rodríguez,³ Lic. Ana Margarita Obregón,⁴ Téc. José Rodríguez⁵ y Lic. Nadia Rodríguez⁶

RESUMEN

Se aplicó un método de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección temprana de *Leptospiras* spp. en hemocultivos procedentes de pacientes con sospecha de leptospirosis humana. Los métodos moleculares, y en particular la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa y sus variantes, constituyen herramientas muy útiles y específicas, utilizadas en la actualidad con esta finalidad. Se lograron identificar por la reacción en cadena de la polimerasa *Leptospiras* spp. en 41,3 % (33/80) de los hemocultivos a los 7 d de incubación, los que también se clasificaron como positivos por los métodos convencionales. Sin embargo, hubo 20 % (16/80) en los que también por este método se lograron identificar *Leptospiras* spp., pero por los métodos convencionales resultaron ser negativos. De los hemocultivos 38,7 % (31/80) resultó negativo tanto por la reacción en cadena de la polimerasa como por los métodos convencionales. El uso del método de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de hemocultivos, es una alternativa valiosa para la detección temprana y el diagnóstico rápido de *Leptospiras* spp.

Palabras clave: Leptospirosis, RCP, diagnóstico.

El diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana es realizado por diversos métodos; el cultivo bacteriológico resulta la prueba de oro, con la desventaja de que las leptospiras para su multiplicación *in vitro* exigen de medios selectivos y de condiciones de incubación especiales, por lo tanto, el período de incubación es prolongado, que abarca hasta los 6 meses, por lo cual pudiera verse interrumpido el crecimiento por factores como el agotamiento de nutrientes, cambios de pH, excreción de enzimas metabólicas, así como también por la exposición a posibles contaminantes del medio ambiente. Sin embargo, la detección del

agente etiológico para la conducta terapéutica adecuada, y para estudios clínicos y epidemiológicos, cada vez se hace más necesaria, por lo que se buscan nuevos métodos y vías diagnósticas que permitan la detección de las leptospiras en estadios tempranos, donde los métodos moleculares desempeñan un importante papel; entre los cuales se reporta uno muy frecuente basado en la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y sus variantes.¹

En el presente estudio se aplicó un método de la RCP para la detección temprana de *Leptospiras* spp.

¹ Licenciada en Microbiología. Investigadora Aspirante. Profesora Instructora.

² Máster en Ciencias. Doctora en Medicina Veterinaria. Investigadora Auxiliar. Profesora. Instructora.

³ Máster en Ciencias. Licenciado en Microbiología. Profesor Instructor.

⁴ Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Profesora Instructora.

⁵ Técnico de Laboratorio.

⁶ Licenciada en Microbiología. Investigadora Aspirante.

a partir de hemocultivos procedentes de pacientes con sospecha de leptospirosis humana. Esta investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospiras* (LNRL), del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

Fueron recepcionados 80 frascos de hemocultivos que contenían el medio líquido comercial de cultivo EMJH, selectivo para las leptospiras. Estos frascos fueron previamente inoculados con pequeñas cantidades de sangre total (25 µL) procedente de cada paciente en estudio. Se incubaron a una temperatura de 30 °C, durante 7 d. Cumplimentado este tiempo de incubación, fue tomado 1 mL de cada hemocultivo para extraer el ADN genómico. El resto del volumen de cada frasco se mantuvo en las mismas condiciones de incubación, hasta cumplimentar el tiempo requerido empleado para el aislamiento y la clasificación de leptospiras por los métodos convencionales. La extracción del ADN, para la amplificación por la RCP, se realizó por el método de *shock* osmótico y calentamiento. A cada extracción de ADN después se le aplicó el método de la RCP descrito por *Gravekamp* y otros, mediante el juego de cebadores G1-G2 específicos para *Leptospira* spp.^{2,3}

Del total de hemocultivos estudiados, a los 7 d de incubación por el método de la RCP, se lograron identificar *Leptospira* spp. en 41,3 % (33/80), los que también se clasificaron como positivos por los métodos convencionales empleados en el LNRL. Sin embargo, hubo 20 % (16/80) en los que también por el método de la RCP se lograron identificar *Leptospira* spp., pero por los métodos convencionales resultaron ser negativos. De los hemocultivos, 38,7 % (31/80) resultó negativo tanto por la RCP como por los métodos convencionales.

El método de la RCP resultó ser muy ventajoso al lograr obtener resultados positivos a muy pocos días de incubación de cada muestra. Sin embargo, los falsos negativos que se obtuvieron por los métodos convencionales se atribuyó a factores como el tiempo prolongado de incubación, posible

agotamiento de nutrientes, la presencia de contaminantes de mayor velocidad de multiplicación, así como la excesiva cantidad de sangre inoculada, la cual puede inhibir el crecimiento de las leptospiras.

Estos resultados mostraron que el uso del método de la RCP a partir de hemocultivos, es una alternativa valiosa para la detección temprana y el diagnóstico rápido de *Leptospira* spp., y esta técnica también puede ser empleada como alternativa para la detección de leptospiras en cultivos aislados a partir de otras muestras clínicas.

PCR method for the early detection of *Leptospira* spp. in hemocultures from patients suspected of leptospirosis

SUMMARY

The PCR method for the early detection of *Leptospira* spp. in hemocultures from patients suspected of human leptospirosis was applied. Molecular methods and, particularly, the amplification of DNA by PCR, and its variants, are very useful and specific tools used nowadays to this end. *Leptospira* spp. were identified by means of PCR in 41.3 % (33/80) of the hemocultures at 7 days of incubation. They were also classified as positive by the conventional methods. However, it was also possible to identify *Leptospira* spp. in 20 % (16/80) by this method, but they proved to be negative by the conventional methods. Of the hemocultures, 38.7 % (31/80) yielded negative by PCR and by the conventional methods. The use of PCR starting from hemocultures is a valuable alternative for the early detection and rapid diagnosis of *Leptospira* spp.

Key words: Leptospirosis, PCR, diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
2. Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993;139:1691-700.
3. Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MG, Terpstra WJ, Fernández C, et al. International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis "Leptospirosis Habana 2006". The Netherlands: Royal Tropical Institute and La Habana: Instituto "Pedro Kouri"; 2006.

Recibido: 29 de noviembre de 2006. Aprobado: 12 de diciembre de 2006.

Dra. *Carmen Fernández Molina*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, municipio La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 204 6051. Correo electrónico: carmen@ipk.sld.cu