

## Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos

### Evaluation of PCR for molecular confirmation of leptospirosis in fresh tissue samples from deceased people

MSc. Angel Alberto Noda Ramos, Dr. C. Islay Rodríguez González,  
MSc. Yaindrys Rodríguez Olivera, MSc. Anamays Govín Chávez,  
Dr. C. Ana Margarita Obregón Fuentes.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la leptospirosis humana es una enfermedad infecciosa aguda que sin diagnóstico y tratamiento temprano puede conllevar a la muerte del paciente. En Cuba son escasos los estudios relacionados con la detección molecular de *Leptospira* en muestras de fallecidos.

**Objetivo:** evaluar una metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de ADN de leptospirosis patógenas en muestras frescas de tejidos de fallecidos con sospecha de leptospirosis.

**Métodos:** se evaluó y aplicó una PCR para la detección de ADN de *Leptospira* spp. patógenas en el período 2012-2013. Esta PCR se estimó utilizando cultivos de leptospirosis y en tejidos humanos infectados artificialmente con leptospirosis patógenas. Además la PCR se aplicó a muestras de órganos frescos de fallecidos con sospecha de leptospirosis, comparando los resultados con otra PCR reportada y usada para muestras frescas post-mortem.

**Resultados:** la PCR evaluada resultó más sensible que la PCR empleada como referencia, y permitió confirmar la infección por leptospirosis patógenas en el 34,2 % (42/123) de las muestras clínicas de órganos frescos, mientras la de referencia en el 17,9 % (22/123), lo que demuestra la utilidad de esta nueva herramienta.

**Conclusión:** la PCR evaluada constituye una herramienta sensible y útil para la confirmación de leptospirosis en fallecidos.

**Palabras clave:** *Leptospira*, PCR, detección molecular, fallecidos.

## ABSTRACT

**Introduction:** human leptospirosis is an acute infectious disease which can lead to death if the patient is not early diagnosed and treated. In Cuba the research studies on the molecular detection of *Leptospira* in samples from fatal cases are uncommon.

**Objective:** to evaluate a Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology for detection of pathogenic *Leptospira* DNA in fresh tissue samples from deceased persons with suspected leptospirosis.

**Methods:** this study evaluated and applied a polymerase chain reaction (PCR) method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. DNA in the period 2012-2013. The PCR was evaluated using leptospire cultures and in human tissues artificially infected with pathogenic leptospire. Besides, PCR was applied to fresh organ samples from dead people with suspected leptospirosis. The final results were compared with those of other reported PCR that had been used for fresh post-mortem samples.

**Results:** the evaluated PCR was more sensitive than PCR used as reference. It allows confirming pathogenic leptospiral infection in 34.2 % (42/123) of clinical samples from fresh organs whereas the reference one reached 17.9 % (22/123). The aforementioned showed the usefulness of this new tool.

**Conclusions:** the evaluated polymerase chain reaction represents a useful and sensitive tool in leptospirosis confirmation in dead people.

**Key words:** *Leptospira*, polymerase chain reaction, molecular detection, dead people.

---

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis causada por las espiroquetas del complejo patogénico *Leptospira interrogans* sensu lato, y se considera hoy día, una de las enfermedades infecciosas emergentes de mayor importancia a nivel mundial.<sup>1</sup>

La mortalidad por leptospirosis en Cuba constituye un problema serio de salud, que se ha mantenido a través del tiempo, con cifras que oscilan desde 36 hasta 92 casos anuales durante los últimos diez años con un incremento en la letalidad (Anuario estadístico, 2013). De acuerdo a este comportamiento, la importancia de diagnosticar y tratar oportunamente a los pacientes con sospecha clínica y epidemiológica de leptospirosis, se hace incuestionable.

El diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana comprende la realización de métodos bacteriológicos, serológicos y de biología molecular.<sup>2</sup> Particularmente el diagnóstico post-mortem se sustenta en la utilización de herramientas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), aunque pobremente desarrolladas por los expertos en el tema. Como antecedente, en el Laboratorio Nacional de Espiroquetas del IPK (LNE-IPK) se emplea una PCR para la amplificación de 423pb del gen que codifica la lipoproteína de membrana externa LipL32 (PCR 423pb) a partir de muestras de tejidos frescos<sup>3</sup> para la cual no se reporta la sensibilidad analítica ni se evalúa la presencia de inhibidores en las muestras, lo que pudiera inducir a resultados falsos negativos

---

que pudieran estar dados además por la talla del fragmento a amplificar, teniendo en consideración la posible fragmentación del ADN durante la manipulación y transporte de las muestras. También en el LNE-IPK se aplica otra PCR para la confirmación de leptospirosis en muestras de tejidos embebidas en parafina,<sup>4</sup> altamente sensible y específica permitiendo la amplificación de un fragmento de 146 pb del gen *lipL32* (PCR 146pb), así como la detección de inhibición a partir de la amplificación de un fragmento de un ADN endógeno en la muestra.<sup>5</sup>

En aras de perfeccionar la confirmación molecular de la infección por leptospirosis patógenas en muestras de fallecidos, se propuso evaluar la PCR 146pb en este tipo de muestra.

Para ello se compararon las sensibilidades analíticas de las PCR 146 pb y 423 pb mediante la realización de diluciones decimales y seriadas del ADN de *L. borgpetersenii* serovar Castellonis desde  $7 \times 10^6$  geq/reacción hasta 0,7 geq/reacción. El ensayo se llevó a cabo tres veces consecutivas y se definió como límite de detección, la menor concentración de ADN a partir de la cual se logró la visualización del amplicón esperado en el 95 % de las réplicas del ensayo.

Posteriormente se realizó la evaluación de la PCR 146 pb en muestras de tejidos humanos infectadas artificialmente (2 fragmentos de hígado, pulmón y riñón, respectivamente). Se tomaron los fragmentos de órganos, negativos a leptospirosis por estudios anatomopatológicos, se cortaron en pequeñas fracciones de 5 g aproximadamente y se les inoculó 1 mL de la cepa Castellon 3 de *L. borgpetersenii* serovar Castellonis utilizando una jeringuilla y puncionando por varias partes. Una vez culminada la infección se realizaron cortes para obtener cinco réplicas de cada fragmento de órgano, y se procedió a la extracción de ADN de cada uno de ellos con Chelex-100 al 5 % en tampón Tris-EDTA.<sup>6</sup>

La eficacia del proceso de extracción y la ausencia de inhibidores en el producto final se evaluó mediante la aplicación de una PCR que amplifica un fragmento de ADN de 268 pb del gen que codifica la  $\beta$ -globina humana (PCR  $\beta$ -globina).<sup>5</sup> Los extractos de ADN en los que se obtuvo amplificación por la PCR  $\beta$ -globina se les aplicó la PCR 146 pb.

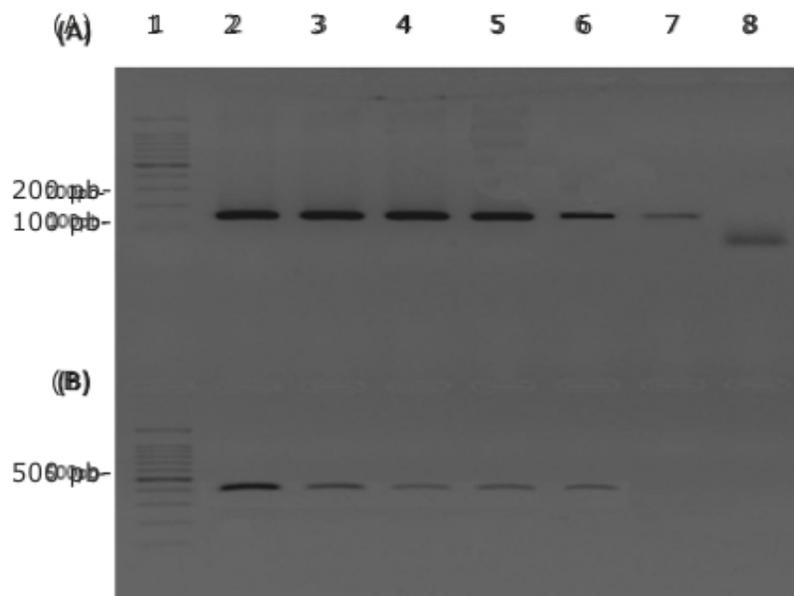
La PCR 146 pb se aplicó a 123 muestras de órganos frescos (riñón, hígado, pulmón, bazo, cerebro, corazón, músculo y ganglio) de 44 fallecidos con sospechas clínicas y epidemiológicas de leptospirosis. Para la extracción de ácidos nucleicos se empleó Chelex-100 al 5 % y se evaluó también la presencia de inhibidores mediante PCR  $\beta$ -globina.

La información de la investigación se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel (*Microsoft Office*). Se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 3.1 para la comparación de proporciones independientes con respecto a la positividad en los órganos estudiados.

Durante el estudio de sensibilidad analítica se corroboró la superioridad de la PCR 146pb con relación a la PCR 423pb, en un orden decimal de dilución (ver [fig.](#)), detectando hasta 7 geq/reacción de PCR en las tres ocasiones en que se realizó el experimento, lo que coincide con lo reportado anteriormente para esta PCR.<sup>4</sup> Se definió 70 geq/reacción como límite de detección para la PCR 423 pb.

La PCR 146 pb mostró 100 % de amplificación en las muestras infectadas artificialmente no inhibidas; siendo estas últimas, una réplica de riñón y otra de hígado. La inhibición obtenida puede ser valorada como mínima si se tiene en

cuenta la falta de etapas de purificación en el protocolo de extracción con Chelex-100, lo que reafirma la utilidad de esta metodología.



**Fig.** Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % mostrando las sensibilidades analíticas de las PCR (A) PCR 146 pb, (B) PCR 423 pb. Carril 1: Patrón de peso molecular; carril 2: 7x106 geq/reacción; carril 3: 7x104 geq/reacción; carril 4: 7x105 geq/reacción; carril 4: 7x103 geq/reacción; carril 5: 7x102 geq/reacción; carril 6: 7x10 geq/reacción; carril 7: 7 geq/reacción; carril 8: 0,7 geq/reacción.

Según la literatura revisada, el Chelex-100 como agente quelante no ha sido empleado ampliamente para la extracción de ADN para leptospiras, solo para la detección de estas en tejidos embebidos en parafina,<sup>4</sup> lo que dificulta la comparación de los niveles de inhibición obtenidos en la presente investigación con otros reportados, aunque es válido destacar el uso exitoso del Chelex-100 en muestras de órganos de fallecidos para la detección de otros microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*,<sup>6</sup> virus herpes 8,<sup>7</sup> virus de la Hepatitis C,<sup>8</sup> *Mycobacterium bovis*,<sup>9</sup> entre otros; lo que demuestra su utilidad y eficacia para estos fines.

La PCR  $\beta$ -globina mostró inhibición en tres de las muestras de órganos frescos (hígado, riñón y corazón) en las cinco réplicas utilizadas durante el estudio de los fallecidos, lo que conllevó a la exclusión de las mismas para la aplicación de la PCR en busca de leptospiras. La PCR 146pb mostró positividad en el 34,2 % (42/123) de las muestras, las que correspondían a 16 fallecidos, mientras que la PCR 423 pb resultó positiva en el 17,9 % (22/123) de las muestras, correspondientes a 9 fallecidos. Los resultados obtenidos por las PCR aplicadas en relación al órgano estudiado se muestran en la [tabla](#).

En la literatura revisada existen pocos reportes sobre la detección molecular de leptospiras en muestras de órganos frescos de fallecidos con sospechas clínicas de leptospirosis, lo que dificulta la posibilidad de comparación en cuanto a la positividad encontrada en esta investigación. Por ejemplo, Rodríguez *et al.*<sup>3</sup>

estudiaron 171 muestras de tejidos frescos de diferentes órganos de 50 fallecidos por PCR 423 pb en busca de material genético de leptospiras patógenas, confirmando su presencia en el 21 % (36/171) de las muestras, resultado similar al encontrado en esta investigación al emplear la misma metodología, aunque con la PCR 146 pb los valores de positividad se mostraron superiores.

**Tabla.** Proporción de positividad según órgano por PCR

Órgano	PCR 423 pb	PCR 146 pb
	% (proporción)	% (proporción)
Riñón	16,2 (6/37)	29,7 (11/37)
Hígado	14,3 (5/35)	28,6 (10/35)
Pulmón	30 (9/30)	60 (18/30)
Cerebro	0 (0/2)	0 (0/2)
Corazón	16,7 (1/6)	33,3 (2/6)
Músculo	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)
Bazo	0 (0/6)	0 (0/6)
Ganglio	0 (0/1)	0 (0/1)

La positividad mayor se encontró en las muestras de pulmón estudiadas, y al comparar las proporciones de la positividad encontrada entre este órgano y el resto de los órganos dianas fundamentales (riñón e hígado) se evidenció diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), lo que reafirma al pulmón como diana fundamental de la infección por leptospiras en los pacientes estudiados, hecho que se reporta con mayor frecuencia durante los últimos años, sustentado en el síndrome hemorrágico pulmonar asociado a leptospirosis.<sup>4,10,11</sup>

Dado el problema de salud que representa la leptospirosis en Cuba, la aplicabilidad de la PCR 146 pb en tejidos frescos de fallecidos con sospecha clínica y epidemiológica de leptospirosis, fortalece las capacidades diagnósticas del LNE-IPK y del país, lo que permitirá disponer de un diagnóstico rápido y certero, además de una metodología de elevado valor investigativo y epidemiológico, útil también en otras regiones.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Virginia Capó por sus consejos oportunos y por permitir la colaboración llevada a cabo durante la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gangadhar NL, Prabhudas K, Bhushan S, Sulthana M, Barbuddhe SB, Rehaman H. *Leptospira* infection in animals and humans: A potential public health risk in India. Rev Sci Tech. 2008;27(3):885-92.

2. Dassanayake DL, Wilmalaratna H, Agampodi SB, Liyanapathirana TA, Goonapienuwala BL. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis.* 2009;9:48-55.
3. Rodríguez Y, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez JE, Valdés Y, Echevarria E, *et al.* Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011. *Rev Cubana Med Trop.* 2013;65:211-22.
4. Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(5):411-15.
5. Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrilă L. Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *J Cell Mol Med.* 2004;8(2):232-40.
6. De Armas Y, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. *Rev Esp Patol.* 2006;39:171-4.
7. Pak F, Pyakural P, Kokhaei P, Kaaya E, Pourfathollah AA, Selivanova G, *et al.* HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Cutan Pathol.* 2005;32(1):21-7.
8. Akyol G, Dash S, Shieh YS, Malter JS, Gerber MA. Detection of hepatitis C virus RNA sequences by polymerase chain reaction in fixed liver tissue. *Mod Pathol.* 1992;5(5):501-4.
9. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microb.* 1995;43(2):227-40.
10. Gouveia EL, Metcalfe J, Carvalho ALF, Aires SF, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, *et al.* Leptospirosis associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):234-40.
11. Assimakopoulos SF, Fligou F, Marangos M, Zotou A, Psilopanagioti A, Filos KS. Anicteric leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome: a case series study. *Am J Med Sci.* 2012;344(4):326-9.

Recibido: 1 de abril de 2014.

Aprobado: 4 de agosto de 2014.

*MSc. Angel Alberto Noda Ramos.* Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba. Correo electrónico: [angelalberto@ipk.sld.cu](mailto:angelalberto@ipk.sld.cu)