

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE PCR EN TIEMPO REAL
BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN LIPL32 PARA LA DETECCIÓN
DE ESPECIES PATÓGENAS DE *LEPTOSPIRA* EN MUESTRAS DE SANGRE
Y ORINA**

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

MVZ. ERIKA SELENE HERNÁNDEZ ROBLES

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DICIEMBRE, 2015.

Desarrollo de una Plataforma de PCR en Tiempo Real Basada en la Amplificación del Gen LipL32 para la Detección de Especies Patógenas de *Leptospira* en Muestras de Sangre y Orina

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Veterinarias

**DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
DIRECTOR DE TESIS**

**DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
ASESOR**

**DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ HURTADO
ASESOR**

RESUMEN

Desarrollo de una plataforma de PCR en tiempo real basada en la amplificación del gen LipL32 para la detección de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de sangre y orina

La leptospirosis es la infección producida por especies patógenas de espiroquetas del género *Leptospira* y es considerada como la enfermedad zoonótica bacteriana más frecuente en todo el mundo. Los animales funcionan como reservorios de leptospiras excretándolas a través de la orina y contaminando fuentes de aprovisionamiento de agua y alimentos, que al entrar en contacto con un huésped susceptible humano o animal, perpetúan el ciclo de la enfermedad. La mayoría de los casos de leptospirosis son diagnosticados mediante pruebas serológicas, sin embargo; los anticuerpos se detectan en la sangre después una semana después del inicio de los síntomas postergando el inicio de los tratamientos. Recientemente, las técnicas que utilizan el RT-PCR se han convertido en la herramienta molecular más utilizada para la detección y diagnóstico de leptospiras debido a su alta sensibilidad y especificidad a partir de una gran variedad de muestras biológicas. De ellas, las que utilizan el gen LipL32 que codifica para una proteína inmunoreactiva dominante que se expresa exclusivamente en las cepas patógenas de *Leptospira*, se ha convertido en un excelente objetivo para la amplificación por RT-PCR de leptospiras patógenas en distintos tipos de muestras biológicas, permitiendo una discriminación entre las serovariedades saprófitas y el establecimiento de un diagnóstico más rápido y eficiente. En el presente trabajo, se desarrolló e

instrumentó un sistema RT-PCR que amplifica un fragmento de ADN del gen LipL32 a partir de muestras de sangre completa y orina. Para la instrumentación de la plataforma RT-PCR para *Leptospira*, se probaron 79 muestras de ADN extraídas de muestras de sangre de las cuales 60 (75.95%) resultaron positivas, asimismo; se probaron 60 muestras de orina de las cuales 8 (13.33%) resultaron positivas, resultando en una plataforma de diagnóstico molecular altamente sensible y específica para la detección de leptospiras patógenas a partir de muestras de sangre y orina. La plataforma RT-PCR para *Leptospira* desarrollada en este trabajo, puede convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rápido y certero en casos individuales, en situaciones de brotes epidémicos de esta enfermedad, así como para establecer un diagnóstico diferencial con brotes de enfermedades febriles indiferenciadas. Asimismo, se recomienda la validación de la plataforma RT-PCR para *Leptospira* con muestras de pacientes que cuenten con historial clínico a fin de establecer los parámetros y condiciones más apropiados de su uso en el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave: *Leptospira*; Leptospirosis; PCR en tiempo real; Diagnóstico; LipL32

ABSTRACT

Development of a real-time PCR platform based on amplification of LipL32 gene for detecting pathogenic *Leptospira* in samples of blood and urine

Leptospirosis is an infection caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* and is considered the most important and frequent bacterial zoonotic disease worldwide. The animals serve as reservoirs of *Leptospira* excreting through the urine contaminating sources of water and food supply, which on contact with an animal or human susceptible host, perpetuate the cycle of disease. Most cases of leptospirosis are diagnosed by serological tests, however; antibodies are detected in the blood seven days after the onset of symptoms delaying the start of treatment. Recently, techniques using RT-PCR has become the most commonly used molecular tool for the detection and diagnosis of leptospirosis due to its high sensitivity and specificity using different biological samples. Of these, those using the gene encoding the LipL32 dominant immunoreactive protein expressed exclusively in pathogenic strains of *Leptospira*, it has become an excellent target for amplification by RT-PCR of pathogenic leptospire in different types of biological samples, allowing discrimination between saprophytic serovars and the establishment of a more rapid and efficient diagnosis. In this paper, we developed and instrumented an RT-PCR system that amplifies a DNA fragment of the LipL32 gene from whole blood samples and urine. For the instrumentation of the RT-PCR platform for *Leptospira*, 79 DNA samples extracted from blood samples were tested, from which 60 (75.95%) resulted positive. Also, 60 urine were tested samples from

which 8 (13.33%) resulted positive. Our RT-PCR platform showed to be highly sensitive and specific molecular diagnostic platform for the detection of pathogenic leptospires from blood and urine samples. The RT-PCR platform for *Leptospira* developed in this work can be used as a valuable tool for rapid and accurate diagnosis of individual cases, cases from outbreaks of disease, and to establish a differential diagnosis with outbreaks of febrile undifferentiated illnesses. It is recommended the validation of RT-PCR platform for *Leptospira* using samples with clinical history available in order to establish the most appropriate parameters and conditions to be applied in the diagnosis of this disease.

Keywords: *Leptospira*; Leptospirosis; Real-time PCR; Diagnosis; LipL32

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Leptospirosis	4
Epidemiología	7
Diagnóstico	10
<i>Diagnóstico serológico de leptospirosis</i>	10
<i>PCR para diagnóstico de leptospirosis</i>	12
Gen LipL32 de <i>Leptospira</i>	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Localización del área de estudio	17
Muestras	17
Procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre y orina	18
<i>Muestras de sangre</i>	18
<i>Muestras de orina</i>	19
Extracción de ADN	19
Oligonucleótidos para LipL32	20
Reconstitución de oligonucleótidos	22
Control positivo de ADN para <i>Leptospira</i>	22
Estandarización de reactivos para RT-PCR	23
Pruebas RT-PCR	25
Interpretación de resultados	26
RESULTADOS	27

Estandarización del RT-PCR para <i>Leptospira</i>	27
Desempeño de controles positivos del RT-PCR para <i>Leptospira</i>	27
Resultados del RT-PCR para muestras de sangre	30
Resultados del RT-PCR para muestras de sedimento de orina	32
Resultados del RT-PCR para muestras de sangre y orina	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
ANEXOS	47
1. Extracción de ADN de muestras de sangre	47
2. Extracción de ADN de muestras de orina	49
3. Extracción de ADN de control positivo para <i>Leptospira</i>	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Especies de <i>Leptospira</i> y algunas serovariedades comunes	6
2	Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de LipL32 con referencia <i>GenBank</i> JN886739.1	21
3	Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de <i>Leptospira</i>	24
4	Desempeño de controles positivos del RT-PCR para <i>Leptospira</i>	29
5	Resultados del RT-PCR para muestras de sangre y orina de perros capturados en el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali	31
6	Resultados positivos combinados del RT-PCR para <i>Leptospira</i> entre muestras de sangre y orina	33

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Curva de amplificación utilizando los oligonucleótidos Lepto1F y Lepto1R a una concentración de 400 nM con 2 µl de ADN template	28
2	Curva de disociación (T _m) de los controles positivos del RT-PCR para <i>Leptospira</i> mostrando una temperatura promedio de 81.88 °C	28
3	Curva de amplificación de muestras de sangre probadas por el sistema RT-PCR para <i>Leptospira</i>	30

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es la infección producida por especies patógenas de espiroquetas del género *Leptospira*, es considerada como la enfermedad zoonótica bacteriana más frecuente en todo el mundo y se reconoce como una enfermedad infecciosa emergente que significa un problema para la salud pública, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (World Health Organization, 2003; Hauk et al., 2008; Pappas et al., 2008; Chen et al., 2013). Los síntomas de la leptospirosis frecuentemente se confunden con los de otras enfermedades febriles como la influenza, el dengue o la malaria, lo cual hace indispensable establecer un diagnóstico temprano, mismo que debe ser confirmado antes del quinto día, cuando el tratamiento con antibióticos es más eficaz (Ahmed et al., 2009; Chen et al., 2013).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es el método serológico de referencia utilizado hoy en día para el diagnóstico de leptospirosis, sin embargo; es técnicamente complejo y necesita mucho tiempo para su ejecución además que incrementa el riesgo de bioseguridad entre el personal del laboratorio (Chen et al., 2013). Otros métodos de diagnóstico de la leptospirosis incluyen el aislamiento de la bacteria de tejidos o fluidos corporales, sin embargo; ninguno de estos métodos tiene la capacidad de producir resultados lo suficientemente rápido para tomar la decisión de iniciar el tratamiento

antibiótico pertinente lo más temprano posible después de la infección (Stoddard et al., 2009; Chen et al., 2013).

Como alternativa al diagnóstico de *Leptospira* por los procedimientos serológicos antes mencionados, durante la última década se han venido aplicando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y más recientemente, técnicas de PCR en tiempo real para el diagnóstico de leptospirosis con niveles de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%, muy superiores a los que ofrecen las pruebas serológicas de rutina, eliminando la necesidad obtener un cultivo bacteriológico positivo para confirmar la presencia de leptospiras y con la ventaja adicional de generar resultados en horas en lugar de semanas o meses (Stoddard et al., 2009). A pesar de las ventajas que las técnicas PCR en tiempo real ofrecen para la detección de leptospiras, a la fecha solo existen unos cuantos procedimientos diseñados para diferenciar las especies de leptospiras patógenas de las especies saprófitas y la gran mayoría de esos procedimientos han sido desarrollados para detectar la presencia de *Leptospira* en humanos con números limitados de muestras (Stoddard et al., 2009; Roczek et al., 2008).

En la búsqueda de plataformas de detección más eficientes para *Leptospira*, capaces de diferenciar entre cepas patógenas de las saprófitas, se han identificado genes candidatos para el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico molecular para esta enfermedad. De ellos, destaca la proteína de adhesión conocida como LipL32, una lipoproteína de 32-kDa que representa

un 75% del proteoma de la membrana externa de la bacteria. La proteína LipL32 se expresa abundantemente y es altamente conservada en todas las especies patógenas de *Leptospira* con un promedio de identidad de aminoácidos superior a 98% y que no se codifica ni expresa en las especies de leptospirosas saprofitas. La característica de expresión solo en las cepas patógenas de *Leptospira* ubica al gen que codifica para la proteína LipL32 como base para el desarrollo de plataformas de detección y diagnóstico de leptospirosis empleando el PCR en tiempo real (Hauk et al., 2008; Murray et al., 2009; Stoddard et al., 2009).

El objetivo de este trabajo es desarrollar una plataforma de PCR en tiempo real basada en la amplificación del gen LipL32 para detectar leptospirosas patógenas en muestras de sangre y orina de perros sacrificados en el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali, B.C.

REVISIÓN DE LITERATURA

Leptospirosis

El agente etiológico de la leptospirosis es un grupo de bacterias gram negativas pertenecientes al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*. Las leptospiras son microorganismos aerobias obligadas, largas, delgadas y con forma de espiral, con las extremidades incurvadas en forma de gancho y que tienen una gran motilidad, usualmente miden 0.1 por 6 a 20 μm , la amplitud helicoidal es de 0.1 a 0.15 μm y la longitud de onda es de aproximadamente 0.5 μm . Para la visualización directa de las leptospiras se requiere de microscopía de campo oscuro o de contraste de fase a partir de preparaciones frescas ya que las bacterias no se tiñen bien. El cultivo microbiológico de leptospiras requiere de una temperatura óptima de crecimiento entre 28-30°C empleando medios de cultivo simples de tripticasa de soya enriquecidos con 10% de suero de conejo o 1% de albúmina sérica bovina, ácidos grasos de cadena larga, vitaminas B1 y B12 y sales de amonio a un pH 6.8 a 7.0. Los ácidos grasos de cadena larga se utilizan como única fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Adler y de la Peña, 2010).

El género *Leptospira* está dividido en dos especies: *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) que comprenden las cepas patógenas y *Leptospira biflexa* (*L. biflexa*) que agrupa las cepas saprofitas aisladas del medio ambiente. Se han registrado más de 60 serovariedades de *L. biflexa* mientras que para *L. interrogans* se reconocen más de 200 cepas organizadas en 24 serovariedades (cuadro 1) (Levett, 2001).

Las leptospiras tienen una estructura de doble membrana donde la membrana citoplasmática y la pared celular están estrechamente relacionadas y se superponen por una membrana externa. En la membrana externa, los lipopolisacáridos (LPS) constituyen uno de los principales antígenos de *Leptospira*, además de distintas lipoproteínas estructurales y funcionales denominadas LipL32, LipL21 y LipL41, las cuales conforman parte de la membrana externa y se expresan abundantemente en la superficie de la bacteria (Cullen et al., 2004; Cullen et al., 2005). De las lipoproteínas que conforman la membrana externa de las leptospiras destaca la LipL32, una proteína de 32 kDa que se expresa exclusivamente en las especies patógenas de leptospiras probadas hasta la fecha y es altamente conservada entre ellas, con un promedio de identidad de aminoácidos de más del 98% y que se ha demostrado que no se expresa en las especies saprofitas de esta familia de microbios (Murray et al., 2009).

Cuadro 1. Especies de *Leptospira* y serovariedades comunes

Especie	Serovariedad
<i>L. alexanderi</i>	
<i>L. biflexa</i> *	
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum, Hardjobovis
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. inadai</i> **	
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis, Australis, Canicola, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Lai, Pomona
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa
<i>L. meyeri</i> **	
<i>L. noguchii</i> *	Panama
<i>L. parva</i> *	
<i>L. santarosai</i>	
<i>L. weilii</i>	
<i>L. wolbachii</i> *	

**L. wolbachii*, *L. biflexa*, y *L. parva* son especies que consisten sólo de cepas no patógenas.

**especies que contienen serovariedades no patógenas.

Fuente: Levett, 2004.

Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial donde los seres humanos son huéspedes ocasionales en un ciclo biológico que involucra una gran variedad de animales silvestres y domésticos. Los animales funcionan como reservorios de leptospiras excretándolas a través de la orina y contaminando fuentes de aprovisionamiento de agua y alimentos, que al entrar en contacto con un huésped susceptible humano o animal, perpetúan el ciclo de la enfermedad (Picardeau, 2013).

La leptospirosis es un importante problema de salud pública en muchos países del mundo, pero particularmente en América Latina y en Asia sudoriental afectando significativamente a estratos poblacionales pobres que habitan zonas urbanas marginales con sistemas de saneamiento deficientes o insuficientes que favorecen la exposición y contacto con las leptospiras, además de los grupos expuestos por cuestiones ocupacionales como veterinarios, empleados de plantas sacrificadoras de ganado, cuidadores de ganado y empleados de granjas, donde las medidas de bioseguridad, vigilancia epidemiológica y control están fallando o no existen. El número de casos de leptospirosis severa se estima en más de un millón al año, con una tasa de mortalidad de alrededor del 10% con una incidencia anual que oscila entre 0.1 y 1 por cada 100 000 habitantes en regiones con clima templado y con incidencia superior a 10 casos por cada 100 000 habitantes en regiones tropicales (Abela-Rider et al., 2010).

La infección humana resulta de la exposición a la orina infectada de los mamíferos portadores, ya sea directamente o a través de la contaminación del suelo o el agua (Bharti et al., 2003). Las leptospiras entran al cuerpo a través de abrasiones o cortes en la piel, o a través de la conjuntiva. También se ha documentado transmisión por ingestión de agua; también puede ocurrir la infección a través de las membranas mucosas de las vías respiratorias y en raras ocasiones, puede ocurrir la infección provocada por mordeduras de animales (Levett, 2004).

La mayor parte de los casos de leptospirosis son diagnosticados mediante el uso de pruebas serológicas, sin embargo; los anticuerpos se detectan en la sangre más de una semana después del inicio de los síntomas, disminuyendo la efectividad de los tratamientos. El diagnóstico bacteriológico es difícil debido a que los medio de cultivo requieren de aditivos especiales y el tiempo para lograr un cultivo positivo de leptospiras toma varias semanas o incluso meses, atrasando el inicio de la terapia. Durante la última década, la detección de leptospiras se ha venido realizando a través de técnicas PCR donde la detección de ADN bacteriano se logra desde etapas tempranas de infección y la tendencia es que sustituyan a las pruebas serológicas (Picardeau, 2013; Abela-Rider et al., 2010).

Los informes sobre tasas de prevalencia en especies animales productivas o animales de compañía son variables y no se reportan de forma constante ya que debido a la ubicación geográfica para el caso de especies

productivas, puede ser afectada por la poca disponibilidad de laboratorios especializados en el diagnóstico de leptospirosis, además de la falta de información sobre la aplicación y tipo de vacunas de los animales probados (Hartskeerl et al., 2011). Para el caso de los animales de compañía, los perros son el reservorio natural para leptospiras del serogrupo *canicola*, lo cual ha sido confirmado a través de varios años de escrutinio serológico en animales vacunados y no vacunados (Andre-Fontaine, 2006). Estudios recientes reportaron tasas de prevalencia serológica de *Leptospira* entre 3% y 25% en perros de compañía, de 4.9% a 84% en los perros callejeros y 14% a 49% en animales alojados en las perreras (Weese y Fulford, 2011).

En México, los estudios sobre leptospirosis canina reportan tasas de prevalencia serológica entre 18.0% y 35.0% en perros aparentemente sanos donde *Leptospira canicola* ha sido la serovariedad más frecuentemente encontrada con el 65% de los casos, seguido de *Leptospira icterohaemorrhagiae* con el 11.4%, *Leptospira panama* con 9.3%, *Leptospira pyrogenes* con 7.9% y otras serovariedades con el 6.4% (Jiménez et al., 2008).

Diagnóstico

Diagnóstico serológico de leptospirosis

El diagnóstico serológico de leptospirosis se realiza por la técnica de aglutinación microscópica (MAT) usando antígenos vivos y es considerada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Internacional de Salud Animal (OIE) como la prueba de oro para diagnóstico de infección por *Leptospira*. La prueba MAT consiste en hacer reaccionar diluciones seriadas de sueros de pacientes sospechosos con una suspensión constante de antígeno de *Leptospira*, por lo que se tiene que utilizar una batería de antígenos que incluya todas las serovariedades de leptospirosis patógenas más importantes en la región, además que es frecuente incluir alguna de las serovariedades no patógenas. Después de un periodo de incubación, las mezclas de suero y antígeno se examinan mediante microscopía de campo oscuro en busca de la formación de aglutinación y precipitación del microorganismo y se establece como título la dilución donde ocurrió la última aglutinación. El diagnóstico positivo se obtiene cuando se observa un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos en un periodo de 3 semanas o un título alto único, siempre y cuando el animal no haya recibido vacunación en los últimos tres meses. Los criterios de interpretación de la prueba indican que títulos de 1:50 son sospechosos y de 1:100 ó mayores deben considerarse como positivos. Títulos de 1:100 a 1:200 son de importancia principalmente en animales no vacunados. Un solo título de 1:800 se utiliza generalmente como el

punto de corte, pero se ha recomendado el uso de un título de 1:3,200 o mayor para considerarlo como positivo. La administración de terapia antimicrobiana temprana puede disminuir la magnitud del aumento de los títulos y la administración de vacunas puede causar un aumento en el título de anticuerpos, sin embargo rara vez excede 1:800, además que los títulos de anticuerpos se mantienen por corto tiempo (Luna et al., 2008; Weese y Fulford, 2011).

Para el diagnóstico de leptospirosis canina, durante la primera semana de la enfermedad los perros suelen producir resultados negativos al MAT ya que los anticuerpos generalmente aparecen entre el sexto y doceavo día posterior a la infección y pueden permanecer serológicamente positivos por meses o años, por lo que es posible detectar animales infectados durante la fase aguda o de convalecencia de la infección (Luna et al., 2008; Sykes et al., 2011).

Desafortunadamente la prueba MAT es peligrosa de realizar debido a la necesidad de mantener cultivos vivos de serovariedades patógenas de leptospiras. La prueba MAT es además técnicamente exigente y consume mucho tiempo, especialmente cuando el panel de leptospiras es grande. Un obvio pero definitivo defecto del MAT es que los anticuerpos no pueden ser detectados hasta al menos una semana después de la infección, cuando la cepa causante no está representada en el panel o solamente un título bajo es encontrado con una serovariedad que antigénicamente se parece a la ausente

que es la causante de la enfermedad (Chappel et al., 2004; Levett, 2004; Luna et al., 2008).

Debido a la complejidad de la prueba de aglutinación microscópica, también se han desarrollado otras pruebas serológicas como ELISA y fijación del complemento para detección de anticuerpos IgG e IgM, los cuales pueden ayudar a detectar la infección durante la fase clínica antes que MAT, además de establecer diferencia entre los títulos inducidos por vacunación contra enfermedad. Sin embargo, estas pruebas tienen una disponibilidad limitada en el mercado (Levett, 2004; Weese y Fulford, 2011). Actualmente las pruebas serológicas disponibles incluyen la aglutinación macroscópica, hemaglutinación indirecta y la aglutinación en micro cápsula, las cuales son menos sensibles que MAT, con tasas de sensibilidad por debajo del 50% en pacientes con leptospirosis de fase temprana (Guerreiro et al., 2001).

PCR para diagnóstico de leptospirosis

EL PCR es un método de amplificación del ADN a partir de muestras clínicas diversas como sangre, orina o tejidos. El diagnóstico basado en la PCR se ha desarrollado de manera efectiva para una amplia gama de microbios y ha demostrado ser extremadamente útil para la detección de pequeñas cantidades de microbios debido a que ofrece altos niveles de sensibilidad, especificidad y velocidad de amplificación, particularmente en los casos donde las técnicas de cultivo han fallado o han producido resultados inespecíficos. Desde la década

de 1990 se han descrito varias pruebas de PCR para la detección de segmentos específicos de ADN de leptospiras patógenas a partir de distintos fluidos y tejidos corporales (Ahmed et al., 2009).

En los últimos años, la aplicación de técnicas PCR en tiempo real (RT-PCR) se ha convertido en una herramienta muy valiosa para la detección y diagnóstico rápido de leptospirosis a partir de distintos tipos de muestras biológicas como orina, sangre y líquido cefalorraquídeo (Costa et al., 2006; Stoddard et al., 2009; Villumsen et al., 2012). El RT-PCR es capaz de detectar el ADN de leptospiras presentes en la sangre durante los primeros diez días post-infección, cuando el número de leptospiras circulantes son más altos en la sangre. Después de ese tiempo, los organismos también pueden ser encontrados en la orina, por lo que cuando se desconoce la fecha aproximada de infección, pruebas simultáneas de sangre y orina pueden aumentar la sensibilidad diagnóstica del RT-PCR (Cardona et al., 2008; Sykes et al., 2011). El RT-PCR ha sido evaluado en muestras de orina de perro y es capaz de identificar el ADN de varias serovariedades a partir de 100 leptospiras por mililitro de muestra (Luna et al., 2008).

No obstante que las plataformas PCR convencional y RT-PCR son robustas y ofrecen altos niveles de sensibilidad y especificidad, la recolección, manejo y procesamiento de las muestras juegan un papel sumamente importante para el buen desempeño de las pruebas. En ese sentido, se ha demostrado que los tubos de colección de sangre que contienen heparina de

litio o de sodio produjeron distintos grados de inhibición del PCR, mientras que los tubos que contenían citrato de sodio o ácido etildiaminotetraacético (EDTA) permitieron una mayor y más uniforme amplificación (Smythe et al., 2002; Levett et al., 2005).

Asimismo, cuando se extrae ADN a partir de muestras de sedimento de orina se recomienda realizar la extracción de un precipitado obtenido de un volumen inicial de centrifugado ≤ 50 ml orina ya que en el precipitado se acumulan sales minerales y otras sustancias que pueden inhibir la reacción de PCR (Musso y La Scola, 2013). Para el caso de muestras de sangre para detección y diagnóstico de leptospiras por PCR o RT-PCR, el volumen de sangre completa a procesar para extracción de ADN no debe exceder de 1 ml. La sangre completa, el plasma o la capa leucocitaria, son consideradas mejores muestras para detectar el mismo número inicial de leptospiras comparado con el suero de sangre coagulada y centrifugada (Stoddard et al., 2009).

Los primeros ensayos que utilizaron RT-PCR estaban diseñados para amplificar genes comunes para todas las leptospiras, patógenas y no patógenas, incluyendo fragmentos de los genes 16S rRNA, gyrB y secY (Haake et al., 2000; Cullen et al., 2004). Posteriormente se utilizaron genes cuya expresión es específica de las serovariedades de leptospiras patógenas, dentro de los que destacan los genes que codifican para las proteínas de adhesión LipL32, LigA y ligB (Murray et al., 2009; Hauk et al., 2008; Vieira et al., 2013).

De ellos, destaca el gen LipL32, que codifica para una lipoproteína inmunodominante situada en la membrana externa de las leptospiras, el gen es altamente conservado y expresado solo entre las serovariedades patógenas de *Leptospira* y ausente en las serovariedades saprófitas de estas bacterias (Stoddard et al., 2009; Hauk et al., 2012; Vieira et al., 2013).

Las técnicas que utilizan el RT-PCR se ha convertido en la herramienta molecular más utilizada para la detección y diagnóstico de leptospiras debido a su alta sensibilidad y especificidad a partir de una gran variedad de muestras biológicas (Sykes et al., 2011). Las pruebas RT-PCR más comunes para leptospiras están basados en el uso de química con *SYBR Green* y sondas *TaqMan* y tienen la ventaja de producir un resultado mucho más rápido que la PCR convencional y por ser básicamente un procedimiento cerrado, es menos propensa a la contaminación (Ahmed et al., 2009; Stoddard et al., 2009).

Gen LipL32 de *Leptospira*

Las especies patógenas de *Leptospira* expresan antígenos de proteína durante la infección en los mamíferos y se convierten en blancos para la respuesta inmune del huésped. La reciente caracterización molecular de las proteínas de leptospiras como GroEL, DnaK, la porina OmpL1, y las lipoproteínas LipL41 y LipL32 ha permitido la identificación de genes con alto valor tanto para el desarrollo de vacunas de nueva generación, así como para el diseño e instrumentación de plataformas de diagnóstico molecular altamente

sensibles y específicas. El gen de LipL32 codifica para una proteína inmunoreactiva dominante (Chen et al., 2013), fue la primera proteína transmembrana descrita que es expresada exclusivamente en las cepas patógenas de *Leptospira* y ausente en las cepas saprofitas. La estructura del gen que codifica para LipL32 consta de 960 pares de bases (pb) y producen una proteína compuesta por 320 aminoácidos con una secuencia media de identidad de 99.1% con las serovariedades patógenas de *Leptospira* (Cullen et al., 2005; Chen et al., 2013).

Lo anterior, posiciona al gen que codifica para la proteína LipL32 como un excelente objetivo para la amplificación por RT-PCR de fragmentos de ADN específicos de leptospirosis patógenas en distintos tipos de muestras biológicas, permitiendo una discriminación entre las serovariedades saprófitas y el establecimiento de un diagnóstico más rápido y eficiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

La recolección de muestras se realizó en el Centro Municipal de Control Animal (CMCA) y las pruebas de laboratorio se realizaron en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en la ciudad de Mexicali, Baja California, México.

Muestreos

Se obtuvieron 79 muestras de sangre y 60 muestras de orina para el estudio, las cuales fueron recolectadas de manera aleatoria en perros capturados en el CMCA durante los meses de julio y agosto de 2015. Las muestras fueron tomadas durante el procedimiento de eutanasia a que son sometidos los perros capturados por el CMCA.

Para obtener las muestras de sangre, los perros fueron inicialmente sedados con xilacina vía intravenosa y posteriormente sujetos a una sobredosis de pentobarbital sódico la cual produce un paro cardio-respiratorio sin sufrimiento para el animal. Una vez que el animal llegaba al plano anestésico profundo, se tomaba una muestra de sangre de 5 ml por punción directa al

corazón empleando una jeringa de 10 ml, colocando la sangre en un tubo evacuado con EDTA como anticoagulante. Para obtener las muestras de orina, se realizaba una incisión con un bisturí, de aproximadamente 5 cm en la región caudal del abdomen para lograr un fácil acceso a la vejiga urinaria de donde se obtenía una muestra de 7.5 ml aproximadamente puncionando la vejiga con una jeringa de 10 ml para posteriormente depositarla en tubos cónicos esterilizados de 15 ml de capacidad. Las muestras colectadas fueron identificadas y conservadas en hieleras térmicas con refrigerantes en gel y enviadas a la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del IICV-UABC inmediatamente después de la sesión de muestreo para su procesamiento y almacenamiento.

Procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre y orina

Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron almacenadas en refrigeración a 4°C por un período de 24 horas para permitir la sedimentación de los componentes sanguíneos y la formación de la capa flogística de forma natural. Posteriormente, el plasma se aspiraba con una pipeta de 1000 micro litros (μ l) y se depositaba en alícuotas de 1 ml en tubos de micro centrifuga los cuales fueron almacenados en congelación a -20 °C. La capa flogística se obtenía aspirando suavemente el paquete leucocitario empleando una pipeta de 200 μ l), colectando un volumen de 200 a 300 μ l del paquete celular leucocitario para

depositarlo en un tubo de micro centrifuga esterilizado y proceder inmediatamente a la extracción de ADN.

Muestras de orina

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 3,250 fuerzas centrifugas relativas (RCF) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido con 6 ml de solución salina de fosfatos (PBS) esterilizada con pH 7.4 empleando un vórtex a baja velocidad. Este procedimiento se repitió tres veces para cada muestra a fin de neutralizar el pH de la orina. EL sedimento del último ciclo de centrifugación fue resuspendido en 500 μ l de PBS de los cuales 300 μ l fueron depositados en un tubo de micro centrifuga esterilizado para proceder inmediatamente a la extracción de ADN.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de sangre y orina procesadas se realizó utilizando los juegos de reactivos *Wizard® SV Genomic DNA Purification Kit* de Promega, número de catálogo A1125. Para la extracción de ADN de capa flogística se siguió el protocolo 3.A. (Promega Corporation, 2012) para aislamiento de ADN genómico de muestras de sangre completa en volumen de 300 μ l (anexo 1). Para la extracción de ADN de muestras de orina se siguió el protocolo 3.D. (Promega Corporation, 2012) para aislamiento de ADN genómico de muestras de células de cultivo de tejidos y tejido animal utilizando un

volumen de 300 µl (anexo 2), ambos protocolos suministrados con los juegos de reactivos de Promega. El ADN extraído de ambos tipos de muestras fue reconstituido en un volumen final de 100 µl empleando la solución de rehidratación de ADN suministrada con los juegos de reactivos. Asimismo, el ADN extraído fue almacenado en congelación a -20°C hasta el momento de ejecutar las pruebas RT-PCR.

Oligonucleótidos para LipL32

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína LipL32 de *Leptospira interrogans* serovariedad *Hardjo*, cepa RTCC2821 con numero de acceso al *GenBank* JN886739.1. El gen corresponde a una molécula de ADN lineal de 806 pares de bases publicada en marzo de 2012. Se utilizó el programa *Primer3Plus* versión 2006-2007, que se encuentra en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. A partir de la secuencia del gen LipL32 se generó el oligonucleótido denominado Lepto1F de banda positiva con secuencia 5'-TCGCTGAAATGGGAGTTCGT-3', mientras que para el oligonucleótido denominado Lepto1R de banda negativa, la secuencia es 3'-GCTTTGGCGATTTGGTCAGG-5'; la amplificación de esos oligonucleótidos por RT-PCR genera a un producto de 184 pares de bases. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de LipL32 con referencia *GenBank* JN886739.1

Oligonucleótido		Lepto1F		
Secuencia:	TCGCTGAAATGGGAGTTCGT			
Inicio: 269	Longitud: 20 pb	Tm: 59.7 °C	GC: 50%	
Oligonucleótido:	Lepto1R			
Secuencia:	GCTTTGGCGATTTGGTCAGG			
Inicio: 452	Longitud: 20 pb	Tm: 60.1°C	GC: 55%	
Producto:	184 pb			

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa *Primer3Plus* versión 2006-2007.

Reconstitución de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por BIO BASIC Inc. (Markham, Ontario, Canadá), empacados y enviados liofilizados. Cada uno fue reconstituido con agua grado biología molecular. Brevemente, los tubos con el liofilizado fueron centrifugados a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de seguridad, se agregó a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 mico molar (μM). Los tubos fueron mezclados en vórtex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente a máxima velocidad en vórtex. Para las pruebas RT-PCR, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos fue establecida en $10\ \mu\text{M}$ para lo cual se diluyó la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular, produciendo cinco alícuotas de $200\ \mu\text{l}$ cada una. Las soluciones estándar y de trabajo de oligonucleótidos fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas RT-PCR.

Control positivo de ADN para *Leptospira*

Como control positivo se utilizó ADN extraído de la fracción líquida de la vacuna BOVI-SHIELD GOLD FP5 +L5 (Zoetis, New Jersey, USA), la cual está formulada con cepas bacterianas inactivadas de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. Pomona*; asimismo, la

vacuna contiene una fracción liofilizada que contiene virus inactivados de rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de diarrea viral bovina tipo 1 y tipo 2, virus de parainfluenza y virus sincitial respiratorio bovino, la cual no fue reconstituida ni utilizada para las pruebas de laboratorio de este proyecto. El procedimiento para extracción de ADN fue aplicando el protocolo 3.D (Promega Corporation, 2012) para aislamiento de ADN genómico de muestras de células de cultivo de tejidos y tejido animal utilizando un volumen de 300 μ l, recomendado en los juegos de reactivos de Promega (anexo 3). El ADN extraído para ser usado como control positivo fue separado en alícuotas de 10 μ l y almacenado en congelación a -20°C hasta el momento de ejecutar las pruebas RT-PCR.

Estandarización de reactivos para RT-PCR

Con el propósito de establecer las cantidades y concentraciones óptimas de reactivos para las reacciones de RT-PCR, se probaron los oligonucleótidos por triplicado a 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 μ l, 2 μ l y 3 μ l de ADN templete en un volumen total de reacción de 20 μ l, empleando una mezcla maestra conteniendo *EvaGreen* (Biotium, Hayward, CA, USA), una tinción fluorescente de alta afinidad para ADN de doble banda, no tóxica ni mutagénica (cuadro 3).

Cuadro 3. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de *Leptospira*

Reactivo	200 nM	400 nM	800 nM
Mezcla maestra	10 µl	10 µl	10 µl
ADN templete*	1-2-3 µl individual	1-2-3 µl individual	1-2-3 µ individual
Forward	0.5 µl	1 µl	2 µl
Reverse	0.5 µl	1 µl	2 µl
H ₂ O	8 µl	7 µl	5 µl
Volumen final	20 µl	20 µl	20 µl

* El ADN templete fue agregado al final en una campana de seguridad diferente.

Pruebas RT-PCR

Los extractos de ADN extraídos de las 79 muestras de sangre y 60 muestras de orina fueron probados por duplicado en un termociclador *BioRad* CFX96. En cada corrida se utilizaron cuatro controles positivos de ADN extraído de la vacuna BOVI-SHIELD GOLD FP5 +L5, dos controles negativos conteniendo mezcla maestra sin ADN templete y dos controles negativos conteniendo agua grado biología molecular.

Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra, resultando en un ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación a 60.2°C y un ciclo final de extensión de 30 segundos a 72°C. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 65°C y hasta 95°C para la identificación de curvas de amplificación dentro de la temperatura estimada de 82°C del producto del PCR de 184 pb y discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

Interpretación de resultados

Los resultados de las pruebas RT-PCR fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente obtuvo una señal fluorescente de amplificación antes del ciclo 40, por encima de la línea umbral de control que el programa CFX96 establece de manera automática y que corresponde a 10 veces la desviación estándar del promedio de índice de fluorescencia generada por todas las muestras durante los 10 primeros ciclos de cada corrida. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logre desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos.

RESULTADOS

Estandarización del RT-PCR para *Leptospira*

El gráfico de amplificación y la curva de disociación calculados por el CFX96 de *BioRad* para el sistema RT-PCR de *Leptospira*, demostraron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima amplificación en las muestras se logra utilizando los oligonucleótidos Lepto1F y Lepto1R a una concentración de 400 nM con 2 μ l de ADN template, aplicando un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 60.2 °C y un ciclo final de extensión de 30 segundos a 72 °C. Bajo estas condiciones los controles positivos y negativos para *Leptospira* desarrollaron una señal por encima de la línea umbral (Cq) promedio de 29.46 en 40 ciclos de amplificación (figura 1). Asimismo, la curva de disociación (*Melt Peak*) para el ADN control positivo mostró un rango de temperatura de disociación entre 81.5°C y 82.0 °C, con una temperatura promedio de 81.88°C (figura 2).

Desempeño de controles positivos del RT-PCR para *Leptospira*

Los controles positivos de las corridas para muestras de ADN de capa flogística y sedimento de orina fueron probados por cuadruplicado y las

muestras por duplicado. El promedio de Cq para los controles positivos fue de 29.16 y promedio de Tm de 81.96°C (cuadro 4).

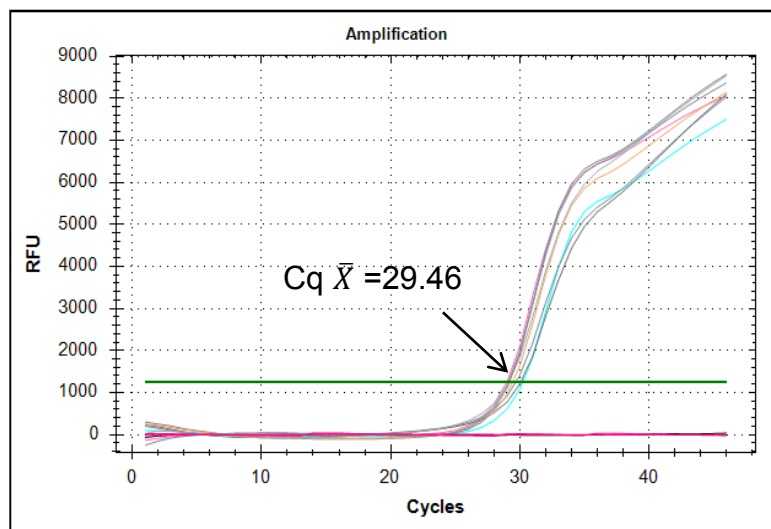


Figura 1. Curva de amplificación utilizando los oligonucleótidos Lepto1F y Lepto1R a una concentración de 400 nM con 2 μ l de ADN template.

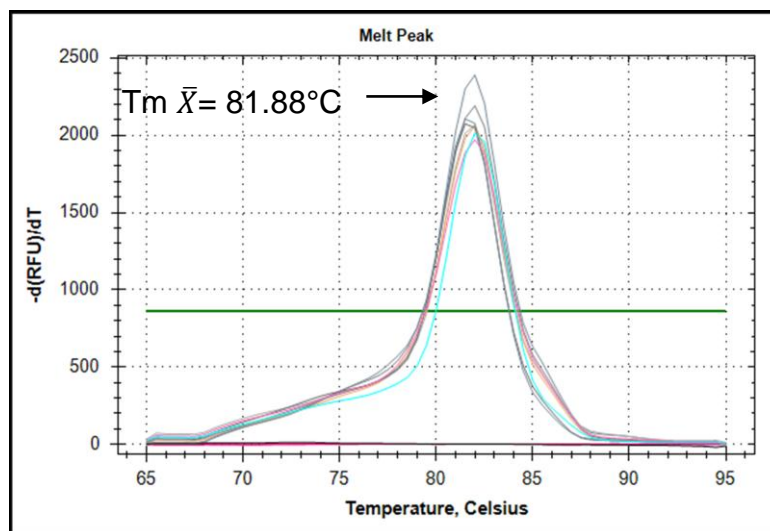


Figura 2. Curva de disociación (Tm) de los controles positivos del RT-PCR para *Leptospira* mostrando una temperatura promedio de 81.88 °C.

Cuadro 4. Desempeño de controles positivos del RT-PCR para *Leptospira*

Promedio Cq	Promedio Tm	Límite Inferior	Límite superior
29.16	81.96 °C	27.72	Cq = 31.22

n = 12

Resultados del RT-PCR para muestras de sangre

Se probaron por duplicado 79 muestras de ADN proveniente de la capa flogística de animales muestreados de las 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. El Cq promedio de este grupo de muestras fue de 31.79 ciclos con un rango Cq entre 24.35 y 39.22 ciclos y Tm promedio de 81.9°C (cuadro 5) (figura 3).

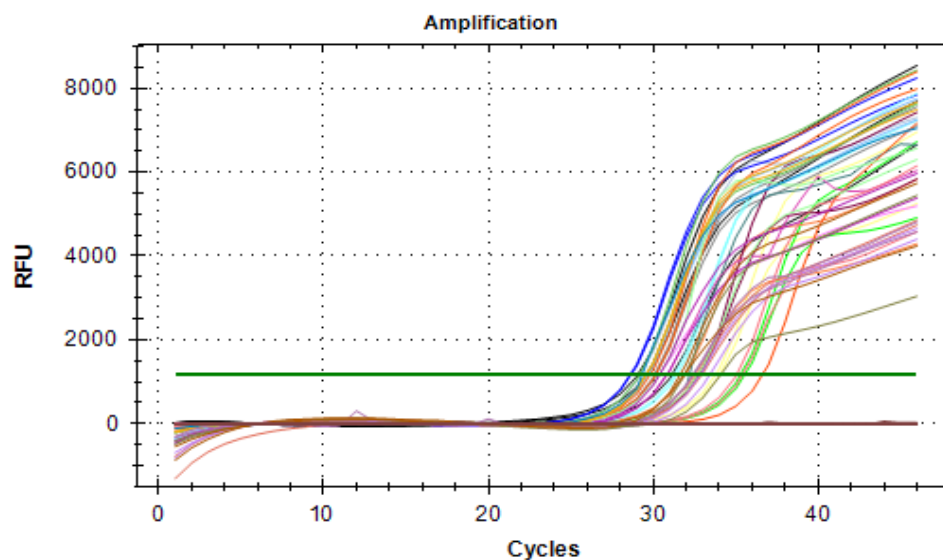


Figura 3. Curva de amplificación de muestras de sangre probadas por el sistema RT-PCR para *Leptospira*.

Cuadro 5. Resultados del RT-PCR para muestras de sangre y orina de perros capturados en el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali.

Muestra	Positivo	Negativo	Cq	Tm
Sangre N = 79	60 (75.95%)	19 (24.05%)	$\bar{X} = 31.79$	$\bar{X} = 81.9\text{ }^{\circ}\text{C}$
			Li = 23.33	
			Ls = 39.22	
Orina N= 60	8 (13.33%)	52 (86.67%)	$\bar{X} = 33.25$	$\bar{X} = 82.25\text{ }^{\circ}\text{C}$
			Li = 27.34	
			Ls = 39.11	

Resultados del RT-PCR para muestras de sedimento de orina

Se probaron por duplicado 60 muestras de ADN proveniente de sedimento de orina de animales muestreados de las cuales 8 (13.33%) lograron una amplificación por encima de la línea umbral que establece el software CFX96 y por lo tanto fueron consideradas como positivas. El Cq promedio de este grupo de muestras fue de 33.25 ciclos con un rango de Cq entre 27.34 y 39.11 ciclos y Tm promedio de 82.25°C (cuadro 5).

Resultados del RT-PCR para muestras de sangre y orina

Al comparar los resultados del RT-PCR para cada tipo de muestra, de las 60 muestras de orina disponibles pareadas con su correspondiente muestra de capa flogística, se encontró que 1 sola muestra resultó positiva para orina exclusivamente, 7 muestras resultaron positivas simultáneamente para sangre y orina, 38 muestras resultaron positivas para sangre exclusivamente y 14 muestras resultaron negativas para ambos tipos de muestras (cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados positivos combinados del RT-PCR para *Leptospira* entre muestras de sangre y orina

Muestra	Frecuencia de resultado positivo
Orina	1
Orina y sangre	7
Sangre	38
Total Positivos	46
Negativos a orina y sangre	14
Total	60

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se desarrolló un sistema RT-PCR donde se utilizan oligonucleótidos que detectan y amplifican exclusivamente el ADN de leptospiras de cepas patógenas. La plataforma de pruebas fue instrumentada utilizando el termociclador y paquetería CFX96 de Bio Rad con química de reactivos que incluye *EvaGreen*, un colorante fluorescente de alta afinidad con el ADN de doble banda que es completamente inocuo para el operador o el medio ambiente; resultando en una plataforma de diagnóstico molecular altamente sensible y específica para la detección de leptospiras patógenas a partir de muestras de sangre y orina.

La plataforma RT-PCR aquí instrumentada, está diseñada para detectar únicamente leptospiras de cepas patógenas debido a que el gen que codifica para la proteína LipL32 no se encuentra presente y por lo tanto no se expresa en leptospiras saprófitas o de patogenicidad intermedia (Haake et al., 2000; Picardeau et al., 2008). La LipL32 se expresa como una lipoproteína en la membrana externa de leptospiras patógenas y funciona como la principal adhesina bacteriana cuya función es establecer el contacto inicial con la matriz extracelular de las células del hospedero durante el proceso de infección (Hoke et al., 2008).

La plataforma RT-PCR desarrollada para detección de leptospiras fue diseñada para utilizar muestras de ADN extraído de la capa flogística de muestras de sangre completa con anticoagulante EDTA debido a que está documentado que el suero sanguíneo, el cual es ampliamente utilizado en pruebas serológicas, no es el mejor tipo de muestra para detección de leptospiras cuando se utilizan plataformas de PCR en tiempo real y que los mejores resultados se obtienen cuando el ADN es extraído a partir de los leucocitos presentes en la capa flogística, debido a que una determinada cantidad de leptospiras son fagocitadas por los glóbulos blancos circulantes y pueden permanecer intactas dentro del fagosoma por varios días (Levett et al., 2005; Kositanont et al., 2007; Izurieta et al., 2008). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el desarrollo de nuestra plataforma, al obtener 60 de 79 (75.95%) muestras con resultado positivo al RT-PCR de *Leptospira*, colocando a este tipo de muestra como el ideal para detección temprana de la enfermedad.

Asimismo, nuestra plataforma RT-PCR para *Leptospira* fue desarrollada para detección y amplificación de ADN extraído de sedimento de muestras de orina cuyo pH fue neutralizado a través de lavados con PBS con el propósito de reducir la posibilidad de inhibición o interferencia con la amplificación del ADN (Levett et al., 2001). De acuerdo con otros estudios, las muestras de orina son sumamente útiles para establecer el diagnóstico de leptospirosis después de la etapa aguda de la enfermedad debido a que *Leptospira* se encuentra presente en la sangre solo por aproximadamente siete días después de la aparición de

los primeros síntomas sin embargo; las leptospiras pueden estar presentes en la orina después de varias semanas del inicio de la enfermedad (Levett et al., 2001; Stoddard et al., 2009).

Si bien en nuestro estudio no fue posible establecer el posible inicio de la enfermedad debido a la ausencia de la historia clínica de los sujetos de muestra, es de suponer que las muestras de animales que resultaron positivos al RT-PCR para *Leptospira*, adquirieron la enfermedad mucho antes de los siete días que reportan otros estudios, lo cual se manifiesta al encontrar 7 de los 8 resultados positivos en muestras de orina con resultado positivo de forma simultánea en la muestra de sangre correspondiente a cada animal. En ese sentido, es de suma importancia establecer con más claridad por cuanto tiempo es posible detectar *Leptospira* en el torrente circulatorio y establecer si la presencia de la bacteria se debe a un tipo de infección recurrente o a re-infección debido a elevadas cargas de leptospiras en el medio ambiente inmediato del paciente. Los resultados de este trabajo confirman lo publicado en estudios previos, en el sentido de que los perros, junto con los roedores, son la fuente más importante de leptospirosis en las comunidades rurales y urbanas de todo el mundo y que la excreción de leptospiras por la orina aumentan el riesgo de leptospirosis en grandes núcleos de población (Miraglia et al., 2013).

La utilización de una plataforma de RT-PCR para leptospirosis como la aquí descrita, puede convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rápido y certero tanto de infección en casos individuales como en situaciones de

brotos epidémicos de esta enfermedad o para establecer un diagnóstico diferencial con brotes de las cada vez más frecuentemente reportadas enfermedades febriles indiferenciadas como dengue, echinococosis, Rickettsia y otras (Hotez et al., 2005).

Es evidente que se requieren de estudios adicionales para validar la plataforma aquí presentada, probando muestras clínicas provenientes de pacientes que cuenten con historial clínico, particularmente para evaluar cuál es el tipo de muestra más apropiada para el RT-PCR dependiendo del tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas, el efecto de la vacunación o la aplicación de terapias con antibióticos, circunstancias que pueden producir un efecto de reducción en el número de leptospiras circulantes en sangre (Levett et al., 2005; Stoddard et al., 2009).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló e instrumentó un sistema RT-PCR altamente sensible y específico para la detección de leptospiras de cepas patógenas en muestras de sangre y orina.

La plataforma RT-PCR para *Leptospira* puede convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rápido y certero en casos individuales, en situaciones de brotes epidémicos de esta enfermedad y para establecer un diagnóstico diferencial con brotes de enfermedades febriles indiferenciadas.

Se hace necesaria la validación de la plataforma RT-PCR para *Leptospira* con muestras de pacientes que cuenten con historial clínico a fin de establecer los parámetros y condiciones más apropiados de su uso en el diagnóstico de esta enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Abela-Ridder B., Sikkema R. y Hartskeerl R.A., 2010. Estimating the burden of human leptospirosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36, Supplement 1, S5-S7.
- Adler B., de la Peña A.M., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 140, Issues 3-4, 27 Jan, pp. 287-296.
- Ahmed A., Engelberts F.M., Boer R.K., Ahmed N., Hartskeerl A.R., 2009. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *PLoS One*. 4(9): e7093.
- Andre-Fontaine G., 2006. Canine leptospirosis “Do we have a problem?” *Veterinary Microbiology*. 117(1): 19-24.
- 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. Review Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Peru-United States Leptospirosis Consortium. *Lancet. Infect. Dis.* Dec; 3(12): 757-71.

- Cardona E.M.N., Moros V.R.M., López L.E.A., Pérez C.J.L., Hernández R.C., 2008. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología; 28: 24-30.
- Chappel R. J., Goris M., Palmer M.F. y Hartskeerl R.A., 2004. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. Dec; 42(12): 5484-5488.
- Chen H.W., Zhang Z., Halsey E.S., Guevara C., Canal E., Hall E., Maves R., Tilley D.H., Kochel T.J., y Ching W.M., 2013. Detection of *Leptospira*-specific antibodies using a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89(6): 1088-1094.
- Costa O.M., Ravara A., Vago, Cota K.M., 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. Journal of Microbiological Methods. Volume 65, Issue 2, May, Pages 247–257.
- Cullen P.A., Haake D.A., Adler B., 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes, FEMS Microbiology Reviews, 28 (2004), pp. 291–318.

Cullen P.A., Xu X., Matsunaga J., Sanchez Y., Ko A.I., Haake D.A., Adler B., 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp, Infection and Immunity, 73, pp. 4853–4863.

Guerreiro H, Croda J., Flannery B., Mazel M, Matsunaga J., Reis M.G., Levett P.N., Ko A.I. y Haake D.A., 2001. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. Infection and Immunity; 69(8): 4958-4968.

Haake D.A., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M., Matsunaga J., Levett P.N., y Bolin C.A., 2000. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. Infection and Immunity; 68(4): 2276-2285.

Hartskeerl R.A., Collares-Pereira M. y Ellis W.A., 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clinical Microbiology and Infection. 17(4): 494-501.

Hauk P., Barbosa A.S., Ho P.L., y Farah C.S., 2012. Calcium Binding to *Leptospira* Outer Membrane Antigen LipL32 Is Not Necessary for Its Interaction with Plasma Fibronectin, Collagen Type IV, and Plasminogen. The Journal of Biological Chemistry; 287(7): 4826-4834.

Hauk P., Macedo F., Romero E.C., Vasconcellos S.A., de Morais 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.

Hoke D.E., Egan S., Cullen P.A, y Adler B., 2008. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and Immunity* 76(5): 2063-2069.

Hotez P.J., Alvarado M., Basañez M., Bolliger I., Bourne R., Boussines M., Brooker S.J., Brown A.S., Buckle G., Budke C.M., Carabin H.I., Coffeng L.E., Fevre E.M., Furst T., Halasa Y.A., Jasrasaria R., Johns N.E., Keiser J., King C.H., Lozano R., Murdoch M.E., O'Hanlon S., Pion S., Pullan R.L., Ramaiah K.D., Roberts T., Shepard D.S., Smith J.L., Stolk W.A., Undurraga E.A., Utzinger J., Wang M., Murray C.J.L. y Naghavi M., 2014. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(7): e2865.

Izurieta R. Galwankar S. y Clem A., 2008. Leptospirosis: The mysterious mimic. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* 1(1): 21-33.

Jiménez M.C., Vado I.S., Cárdenas M.M., Rodríguez J.B., Ortega A.P., 2008. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. 106 (2008) 22–26.

Kositanont U., Rugsasuk S., Leelaporn A., Phulsuksombati D., Tantitanawat S. y Naigowit P., 2007. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(2): 117-22.

Levett P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* Apr; 14(2): 296-326.

Levett P.N., 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Oct*; 4(6): 435-448.

Levett P.N., Morey R.E., Galloway R.L., Turner D.E., Steigerwalt A.G. y Mayer L.W., 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*; 54: 45-49.

Luna A.M.A., Moles C.L.P., Gavaldón R.D, Navad V.C. y Salazar G.F., 2008. La leptospirosis canina y su problemática en México. *Rev. Salud Anim.* 30(1): 1-11.

Miraglia F., Matsuo M., Morais Z.M., Dellagostin O.A., Seixas F.K., Freitas J.C., Hartskeerl R., Moreno L.Z., Costa B.L., Souza G.O., Vasconcellos S.A. y Moreno A.M., 2013. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic

susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Nov; 77(3): 195-9.

Murray G.L., Srikram A., Hoke D.E., Wunder J.E.A., Henry R., Lo M., Zhang K., Sermswan R.W., Ko A.I. y Adler B., 2009. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and immunity*. *Infection and immunity*, 77(3): 952-958.

Musso D., y La Scola B., 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 46(4): 245-252.

Pappas G., Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., y Akritidis N., 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases* 12, p. 351-357.

Picardeau M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. Volume 43, Issue 1, January, Pages 1–9.

Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezzadri S., Davis J.C., McGrath A., Roche D., Johnson M.J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Médigue C. y Adler B., 2008. Genome sequence of

the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS ONE 3(2): e1607.

Promega Corporation, 2012. Wizard® SV Genomic DNA Purification System, Instructions for use of products A2360, A2361 y A2365. Technical Bulletin.

Roczek A., Forster C., Raschel H., Hormansdorfer S., Bogner K.H., Hafner-Marx A., Lepper H., Dobler G., Buttner M., Sing A., 2008. Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. J Med Microbiol 57: 658–663.

Smythe L.D., Smith I.L., Smith G.A., Dohnt M.F., Symonds M.L., Barnett L.J. y McKay D.B., 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infectious Diseases; 2 (13).

Stoddard R.A., Gea J.E., Wilkinsa P.P, McCaustlandb K., Hoffmastera A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Volume 64, Issue 3, July, Pages 247–255.

Sykes J.E., Hartmann K., Lunn K.F., Moore G.E., Stoddard R.A., y Goldstein R.E., 2011. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 25(1): 1-13.

Vieira M.L., Fernandes L.G., Domingos R.F., Oliveira R., Siqueira R.H., Souza N.M., Teixeira A.R.F., Atzingen M.V. y Nascimento A.L.T.O., 2013. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions. *FEMS Microbiol Lett*; 352: 129-139.

Villumsen S., Pedersen R., Binderup B.M., Ahrens P., Skov J.J., Krogfelt K.A., 2012. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *Journal of Microbiological Methods* 91. 184–190.

Weese J.S., y Fulford M.B., 2011. *Companion Animal Zoonoses*. Blackwell Publishing Ltd. Pp.157-164.

World Health Organization, 2003. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance, and control. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>.

ANEXOS

1. Extracción de ADN de muestras de sangre

Se procesaron 79 muestras de capa flogística para extracción de DNA utilizando el kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

- Se recolectó la capa flogística de los tubos de sangre con una micropipeta con capacidad de 200 µl utilizando puntillas con filtro y se colocaron 300 µl en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml previamente rotulados y posteriormente se añadieron 900 µl de Cell Lysis Solution.
- Se invirtieron los tubos 5-6 veces para mezclar y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente invirtiendo 2-3 veces una vez durante la incubación para lisar las células rojas.
- Se centrifugó a 16,000 x *g* por 20 segundos a temperatura ambiente, se retiró y eliminó tanto sobrenadante cómo fue posible sin perturbar el pellet visible.
- Se agitaron los tubos en vórtex vigorosamente hasta resuspender las células blancas.
- Una vez resuspendidas se añadieron 300 µl de Nuclei Lysis Solution, se invirtieron los tubos 5-6 veces para lisar las células blancas y se incubaron

por 30 minutos a 37°C mezclando los tubos cada 5 minutos invirtiéndolos 5-6 veces para deshacer los grumos

- Se añadieron 100 µl de Protein Precipitation Solution y se agitó vigorosamente por 10-20 segundos.
- Se centrifugó a 16,000 x *g* por 3 minutos a temperatura ambiente.
- El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml conteniendo 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló la solución por inversión hasta que las hebras de ADN formaron una masa visible.
- Se centrifugó a 16,000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se añadió al ADN 300 µl de etanol al 70%.
- Se invirtieron los tubos varias veces para lavar el pellet de DNA y las paredes del tubo y se centrifugo a 16,000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se decantó el etanol con cuidado y se invirtieron los tubos en papel absorbente limpio y se dejaron secar al aire durante 15 minutos.
- Se añadieron 100 µl de DNA Rehydratation Solution al tubo y se rehidrató el DNA incubando la solución a 4°C

2. Extracción de ADN de muestras de orina

Se procesaron 60 muestras de orina para extracción de DNA utilizando el kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

- Se descongelaron las muestra procesadas el día anterior en baño maría a 65°C y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml previamente rotulados.
- Se les colocó Parafilm y se congelaron en nitrógeno líquido por un minuto, posteriormente se descongelaron en baño maría a 65°C y cada tubo se trituro por 1 minuto con homogeneizadores hasta obtener un triturado celular homogéneo.
- Se añadió 1 ml de Mili Q ddH₂O esterilizada, se homogenizó brevemente (3 x 1 segundo) en vórtex y se centrifugó a 16,500 x *g* por 3 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante, se reconstituyó el pellet en 200 µl de Mili Q ddH₂O esterilizada y se homogenizó en vórtex.
- Se transfirieron 100 µl, 50 µl o 30 µl (dependiendo del concentrado celular) del homogenizado celular a un tubo limpio de microcentrigufa de 1.5 ml conteniendo 600 µl de Nuclei Lysis Solution y se mezcló suavemente con la pipeta hasta disolver completamente el paquete celular.

- Se incubó la mezcla por 30 minutos a 37°C, mezclando los tubos cada 5 minutos invirtiéndolos 5-6 veces y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se añadieron 200 µl de Protein Precipitation Solution y se mezcló en vórtex a máxima velocidad por 20-30 segundos, posteriormente se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se centrifugó a 16,000 x *g* por 4 minutos y se decantó con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml estéril conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo hasta que las hebras de ADN formaron una masa visible y se centrifugó a 16,000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se decantó con cuidado el sobrenadante y se añadieron 600 µl de etanol al 60 %, se invirtieron los tubos 5-6 veces para lavar el ADN.
- Se centrifugó a 16,000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente y se decantó con cuidado la mayor cantidad posible del etanol.
- Se invirtieron los tubos en papel absorbente limpio y se dejaron secar al aire durante 15 minutos.
- Se añadieron 100 µl de DNA Rehydration Solution al tubo y se rehidrató el DNA incubando la solución a 4°C.

3. Extracción de ADN de control positivo para *Leptospira*

- Se transfirió 1 ml de vacuna en un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 16,000 x g por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células agregando 1 ml de PBS pH 7.4. Se resuspendió el pellet mezclando con el vórtex y triturando con homogeneizadores y se centrifugó a 16,000 x g por 2 minutos. Se repitió 3 veces este paso.
- Se resuspendió el pellet en 200 µl de MilliQ ddH₂O esterilizada y se congeló en Nitrógeno líquido. Se trituraron de nuevo hasta obtener un lisado celular homogéneo.
- Se transfirieron 250 µl del homogenizado celular a un tubo de 1.5 ml estéril conteniendo 600 µl de Nuclei Lysis Solution y se mezcló suavemente con la pipeta hasta disolver completamente el lisado celular.
- Se incubó la mezcla en el termomixer por 5 minutos a 80°C, mezclando los tubos cada minuto. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregaron 3 µl de RNasa y se mezcló invirtiendo el tubo 5-6 veces
- Se incubó en el termomixer por 30 minutos a 37°C, mezclando los tubos cada 5 minutos. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se agregaron 200 µl de Protein Precipitation Solution y se mezclaron en vórtex a máxima velocidad por 20-30 segundos. Se incubó en hielo por 5 minutos.

- Se centrifugó la mezcla por 3 minutos a 16,000 x g y se decantó con cuidado el sobrenadante que contiene el DNA en un tubo de 1.5 ml estéril conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo hasta que las hebras de DNA formaron una masa visible.
- Se colocaron los tubos con el codo de la tapa hacia arriba y se centrifugaron por 2 minutos a 16,000 x g a temperatura ambiente.
- Se decantó con cuidado el sobrenadante ya que el pellet de DNA no está bien adherido al tubo.
- Se agregaron 600 µl de etanol al 70% y se invirtieron suavemente 5-6 veces para lavar el DNA.
- Se centrifugó a 16,000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente colocando el tubo con el codo de la tapa hacia arriba.
- Se decantó con cuidado la mayor cantidad posible de etanol invirtiendo el tubo sobre papel absorbente.
- Se invirtió el tubo sobre papel absorbente para evaporar el etanol restante incubando a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se agregaron 100 µl de DNA Rehydration Solution y se almacenó a 4°C para uso inmediato (7 días).