

Detección y diferenciación molecular de *Leptospira sp.* utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN

Alegre, E.A.¹; De Biasio, M.B.²; Ramírez, N.N.¹; Ruiz, R.M.¹; Bastiani, C.E.¹

¹Cátedra Salud Pública, ²Servicio Veterinario de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel/fax 03794-425753. E-mail: agustina_ea@yahoo.com.ar.

Resumen

Alegre, E.A.; De Biasio, M.B.; Ramírez, N.N.; Ruiz, R.M.; Bastiani, C.E.: Detección y diferenciación molecular de *Leptospira sp.* utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN. Rev. vet. 24: 1, 53-55, 2013. Existen diversas estrategias diagnósticas para identificar leptospiras, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una técnica de alta sensibilidad y especificidad. El presente trabajo tuvo como objetivo optimizar técnicas de extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos y establecer condiciones de PCR multiplex para diferenciar leptospiras saprófitas de patógenas. Para ello se ensayaron técnicas de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) y hervido (boiling). Se analizaron dos secuencias de ácidos nucleicos, correspondientes a una fracción de un gen conservado en ambos grupos de bacterias (ARNr 16S) y otra procedente de una fracción de un gen (LipL32) presente sólo en especies de leptospiras patógenas, las cuales dieron amplicones de 474 y 430 pb respectivamente, utilizándose como controles positivos de amplificación muestras de cultivos bacterianos de *Leptospira icteroahemorrhagiae*, *L. canicola* y apatógena (*Patoc I*), utilizando agua como control negativo. Se concluyó que no existen diferencias en la perdurabilidad del ADN extraído a partir de cepas de referencia al comparar el método de digestión con el detergente CTAB y el de boiling y sus variantes. Considerando el más bajo costo y menor tiempo de desarrollo, este último resultó la mejor alternativa para la obtención de moldes para amplificación por PCR.

Palabras clave: *Leptospira sp.*, diferenciación molecular, extracción de ADN, boiling.

Abstract

Alegre, E.A.; De Biasio, M.B.; Ramírez, N.N.; Ruiz, R.M.; Bastiani, C.E.: Molecular detection and differentiation of *Leptospira sp.* using different DNA extraction techniques. Rev. vet. 24: 1, 53-55, 2013. There are different diagnostic techniques to identify leptospiras; the polymerase chain reaction (PCR) is a method with high sensitivity and specificity. This study aimed to optimize DNA extraction from bacterial cultures and set conditions of multiplex PCR to differentiate saprophytes from pathogens leptospiras. For this, two techniques were tested: cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and boiling. Two sequences were analyzed, corresponding to a fraction of a conserved gene in both groups of bacteria (16S rRNA) and another in a fraction of a gene present only in the pathogenic leptospiras (LipL32). Two amplicons of 474 and 430 pb respectively were obtained using cultures of *Leptospira icteroahemorrhagiae*, *L. canicola* and a pathogenic (*Patoc I*) as positive controls and water as negative control. It was concluded that there was no difference in the durability of DNA extracted from reference strains compare with CTAB digestion and boiling and its variants. Considering its lower cost and time saving, the latter represents a good alternative for PCR amplification.

Key words: *Leptospira sp.*, molecular differentiation, DNA extraction, boiling.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad reemergente que afecta animales silvestres, domésticos y al hombre, reconocida como un importante problema de salud pública^{1,5}. Las técnicas de diagnóstico son diversas y la

elección adecuada de las mismas depende del momento de desarrollo de la enfermedad, etapas de leptospiremia y leptospiruria, posibilidad de muestras pareadas, detección de anticuerpos y presencia de animales vacunados.

Para evidenciar leptospiras se considera como prueba de oro la microaglutinación (MAT), técnica laboriosa para la cual se debe disponer de una batería de

10 serovares diferentes como mínimo. En el caso particular de animales silvestres la toma de muestras pareadas es difícil y no siempre se conoce la prevalencia del serovar en un área geográfica determinada. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, y si bien su desarrollo implica mayor inversión que las técnicas convencionales, el hecho de disponer de un laboratorio equipado minimizaría los costos de diagnóstico por individuo.

La Facultad de Ciencias Veterinarias de Corrientes (Argentina) cuenta desde el año 2010 con un Laboratorio de Biología Molecular en el que no solo se brindan servicios a terceros, sino también se desarrollan proyectos de investigación. En el mismo, como parte del proceso, se buscan las condiciones óptimas para desarrollar cada uno de los métodos utilizados, incorporando las modificaciones que demuestren ventajas respecto de las técnicas descriptas por otros autores.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar diferentes modos de extracción de ADN: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y hervido (boiling) a partir de cultivos bacterianos y establecer las condiciones de PCR multiplex para diferenciar leptospiras saprófitas de patógenas con el fin de aplicarlas a la detección de tales bacterias en animales silvestres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon cepas control provistas por el Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), INTA Castelar (Buenos Aires).

Se ensayaron dos técnicas para la extracción de ADN, una de ellas utilizando CTAB⁶ la cual requirió 700 µl de cultivo en medio Fletcher y otra basada en el hervido⁴ utilizando 250 µl del mismo. En el primer caso dicho material fue previamente sometido a un lavado con solución fisiológica.

Se efectuó una modificación del protocolo original de hervido, consistente en un segundo calentamientos (re-boiling) para lo cual se descongeló una alícuota del material del boiling original y se repitió el procedimiento de hervido antes descrito. Se ensayó un tercer calentamiento (re-re-boiling), para lo cual se tomó como material de partida, parte del producto del re-boiling operando de igual manera que en los casos anteriores y se evaluó el tiempo en que el ADN obtenido en todas sus variantes se mantenía amplificable.

Se analizaron dos secuencias de oligonucleótidos, correspondientes a una fracción de un gen conservado en ambos grupos de bacterias (ARNr 16S) y otra, a una fracción de un gen presente sólo en bacterias patógenas (LipL32), las cuales dieron amplicones de 474 y 430 pb respectivamente⁷. Se utilizaron como controles positivos de amplificación muestras de cultivos bacterianos de *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y apatógena (Patoc I), y agua como control negativo. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo las siguientes concentraciones finales

de reactivos: 1x de buffer PCR (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM de cada dNTPs (Promega), 1,0 mM de cada primer y 1,0 U de Taq DNA polimerasa (Go-Taq, Promega). El programa de ciclado consistió en desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C un minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto) y una extensión final a 72°C por 5 minutos e incubación final a 4°C.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico por PCR es una técnica sensible y rápida, que tiene la capacidad de amplificar ADN de leptospiras detectando un número pequeño de estas bacterias². En el presente trabajo se ensayaron dos técnicas de extracción de ADN (CTAB y boiling) a partir de cepas de referencia, realizando variantes en una de dichas técnicas (boiling). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando una reacción de PCR Multiplex que permitió diferenciar entre cepas de bacterias patógenas y apatógenas.

La técnica que utiliza CTAB presenta la ventaja de proveer ADN purificado, ya que los lisados celulares son sometidos a una extracción con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico, mientras que la técnica de hervido no la utiliza, siendo además la durabilidad del material obtenido del orden de los años versus días³. Sin embargo el menor costo y tiempo requerido para el procesamiento en este último caso, hacen de esta técnica una herramienta muy ventajosa. Como resultado, el ADN obtenido por el método boiling se mantuvo amplificable en todas sus variantes (boiling, re-boiling y re-re-boiling) extendiendo los ensayos comparativos en un plazo de 9 meses.

En todos los casos (CTAB, boiling, re-boiling y re-re-boiling) se observaron bandas de amplificación del tamaño esperado, sin visualizarse cambios en la intensidad de las bandas atribuibles al número de calentamientos a los que las muestras fueron sometidas. Los resultados obtenidos son de suma utilidad, ya que la implementación del método de hervido o cualquiera de sus variantes permitiría minimizar costos y tiempo, a la vez que disminuirían los riesgos de contaminación, inherentes a la manipulación de material durante la extracción de ADN. Resultados obtenidos por otros investigadores demostraron que cuando se aplica el método de extracción de ADN con CTAB, se observa una mayor fluorescencia al transiluminar con luz UV geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, con respecto al material obtenido tras ser sometido a la técnica de boiling, observaciones que coinciden con nuestros resultados⁸.

Se concluye que no existen diferencias en cuanto a la perdurabilidad del ADN extraído a partir de cepas

de referencia de leptospirosis patógenas y apatógenas al comparar el método de digestión con el detergente CTAB y el de boiling y sus variantes. Considerando su más bajo costo y menor tiempo de desarrollo, este último representa la mejor alternativa para la obtención de moldes para amplificación por PCR.

REFERENCIAS

1. **Acha PN, Szyfres B.** 2003. *Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales domésticos*, 3^a ed., Organización Panamericana de la Salud, Washington DC, vol. I, p. 175-186.
2. **Bal AE, Gravekamp C, Hartkeerl RA, Brewster J, Korver H, Terpstra EJ.** 1994. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 32: 1894-1898.
3. **Brown PD, Levett PN.** 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *Med Microbiol* 46: 173-181.
4. **Céspedes MZ, Tapia RL, Balda LJ, Gonzalez DQ, Peralta C, Condori P.** 2007. Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de Leptospirosis humana. *Rev Peru Med Exp Salud Publ* 24: 20-26.
5. **Faine S.** 1994. *Leptospira and leptospirosis*, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida USA, 353 p.
6. **Lodhi MA, Guang Y, Weeden NF, Reisch BI.** 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, vitis species and ampelopsis. *Plant Molec Biol Rep* 12: 6-13.
7. **Magalhães J, Teruszkin I, Sutter F, Dias A, Hillen L, Pereira MM.** 2010. Multiplex PCR-based detection of leptospira in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 353-355.
8. **Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF, Piispanen J.** 1999. Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. *J Microb Methods* 35: 23-30.