

## Caracterización biológica de dos aislados de *Leptospira* spp. procedentes de pacientes colombianos con síndrome de Weil

Biological characterization of two isolates of *Leptospira* spp. from Colombian patients with Weil's syndrome

Harold E. Durango-Galván\*, Juan D. Rodas-González†, Bruno L. Travi‡, Piedad Agudelo-Flórez§

### RESUMEN

Se describe la dinámica de la infección experimental en el modelo hámster de dos aislados de *Leptospira* spp. recuperados de pacientes con síndrome de Weil, procedentes de poblaciones Antioqueñas. La infección experimental se realizó mediante inoculación intraperitoneal de los aislados en hámsteres juveniles. La evaluación de marcadores de función hepática y renal, además de un reactante de fase aguda de inflamación, se realizó en dos momentos postinfección. A los 18 días postinoculación se establece el punto final, colectando sangre y realizando la necropsia, tomando tejido de hígado, riñón y pulmón, para cultivo en EMJH y en formol tamponado para estudio histopatológico. Los resultados de las pruebas de función renal, hepática y la proteína C reactiva fueron variables, y aunque mostraron ligeros aumentos no se correlacionó con la presencia de signos clínicos; sin embargo, en la histopatología se tiene la expectativa de evidenciar algún cambio importante, ya que se obtuvo crecimiento bacteriano a partir del cultivo de riñón e hígado en algunos de los animales. Los resultados de la evaluación de la virulencia a través de la determinación de la dosis letal 50 sugiere que los dos aislados eran poco virulentos o habían perdido virulencia quizás debido a los pases sucesivos *in vitro* a que se sometieron antes de inocularlos en los animales.

### PALABRAS CLAVES

Dosis letal 50. Histopatología. *Leptospira*. Leptospirosis. Modelo animal.

### ABSTRACT

The dynamics of experimental infection in a hamster model are described for two *Leptospira* spp. isolates, recovered from patients with Weil's syndrome from towns in Antioquia. Experimental infection was performed by intraperitoneal inoculation of juvenile hamsters. The evaluation of markers of liver and

kidney function as well as an acute phase reactant was performed at two time points post-infection. At 18 days post-inoculation the end point was set, blood was collected and an autopsy was performed, taking tissue from liver, kidney and lung for cultivation in EMJH and buffered formalin for histopathological studies. The results of tests for renal function, liver and C-reactive protein were variable, and even though they showed

\*Escuela de Microbiología y Bioanálisis Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Grupo Centauro, Escuela de medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Universidad de Texas, San Antonio, Estados Unidos de América. §Instituto Colombiano de Medicina Tropical Universidad CES, Sabaneta, Colombia. Contacto: Harold Durango, [haeduga2000@yahoo.com](mailto:haeduga2000@yahoo.com)  
Recepción: 7-04-2010. Aceptación: 15-04-2010.

slight increases they were not correlated with the presence of clinical signs; however, at the histopathology level one might expect significant changes, since growth was obtained from the cultivation of kidney and liver in some animals. The results of the evaluation of virulence by determining the lethal dose 50 suggests that the two isolates were of low virulence or that virulence had been lost perhaps due to the successive passes *in vitro* before inoculation of the animals.

#### KEY WORDS

Animal model. Histopathology. Lethal Dose 50. *Leptospira*. Leptospirosis.

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis se considera una de las zoonosis más extendidas en todo el mundo. La infección se produce por especies patógenas del género *Leptospira*, un grupo diverso de 17 especies entre las que se encuentran especies patógenas para humanos y hospederos susceptibles, y especies saprófitas que pueden mantenerse en el ambiente. Los humanos la adquieren a través del contacto directo o indirecto de la piel o mucosas con la orina de animales infectados, ya sean silvestres (roedores, murciélagos) o domésticos (bovinos, equinos, porcinos, caninos).<sup>1,2,3,4</sup>

En su forma más común, la leptospirosis se manifiesta como un síndrome febril indiferenciado, anictérico, de comienzo súbito y que no requiere generalmente tratamiento específico. En algunos casos se presentan manifestaciones clínicas severas con ictericia progresiva, hemorragias de curso variable e insuficiencia renal, constituyendo la enfermedad de Weil, clásicamente conocida como la forma grave de la enfermedad y potencialmente fatal en 10% a 15% de los casos. La falla multiorgánica es la consecuencia de una respuesta sistémica a la infección (síndrome de sepsis).

A pesar de los estudios realizados en algunos modelos animales sobre patogenicidad y virulencia de aislados de *Leptospira*, procedentes de casos humanos con síndrome de Weil, no se conoce el comportamiento de los aislados procedentes de pacientes colombianos; además, se desconoce su virulencia y patogenicidad. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la dinámica de infección de aislados de *Leptospira* spp., recuperados de humanos con síndrome de Weil, en

el modelo hámster (*Mesocricetus auratus*) con lo cual se estudia la dinámica del proceso de infección, a través de la valoración de patrones de química clínica y alteraciones histopatológicas en los principales órganos blanco de la infección por *Leptospira*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Leptospira* y cultivo: los dos aislados de *Leptospira* spp. se obtuvieron a partir de pacientes Antioqueños (gentilicio de una región de Colombia), con sintomatología renal asociada a la presentación de síndrome de Weil. Los aislados se mantuvieron en repiques continuos cada dos semanas durante, aproximadamente, 6 a 8 meses. Los cultivos se realizaron en medio líquido EMJH (*Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*, *Becton-Dickinson-Biosciences*) suplementado con 10% de medio de enriquecimiento comercial (*Becton-Dickinson-Biosciences*) e incubados entre 26°C y 30°C en condiciones de aerobiosis.<sup>6</sup> Con el propósito de tener un control de virulencia para fines de comparación de datos se usó la cepa de referencia *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar. Copenhageni cepa L1130 donada por la Fundación FIOCRUZ, Brasil.

#### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

##### DE AISLADOS COLOMBIANOS DE *Leptospira*

Se realizó tipificación molecular de serovariedades patógenas, según la prueba de PCR descrita por Levett et al., 2005<sup>7</sup> y modificada por Moreno y Agudelo (en proceso de publicación). Se amplificó el gen LipL32 que codifica para la lipoproteína del mismo nombre, la cual se encuentra en especies patógenas de *Leptospira*. Las secuencias de los cebadores o iniciadores usados son: LipL32/270F (CGCTGAAATGGGAGTTCG-TATGATT) y LipL32/692R (CCAACAGATGCA-ACGAAAGATCCITT). Estos iniciadores amplifican un segmento de 423 bp entre las posiciones 270 y 692.

Los productos de amplificación se secuenciaron por métodos estándares en el laboratorio de referencia de FioCruz, Brasil. Los datos de las secuencias nucleotídicas se analizaron y se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando la herramienta “genomic BLAST” ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)) para determinar la similitud de la secuencia obtenida con la secuencia de la especie patógena reportada en GenBank.

## CARACTERIZACIÓN DE LA VIRULENCIA EN MODELO EXPERIMENTAL

### INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Se utilizaron, como reactivos biológicos, machos y hembras de hámster Sirio dorado (*Mesocricetus aureatus*), de 55 a 70 g de peso, los cuales fueron infectados intraperitonealmente y monitorizados diariamente para evaluar signos clínicos de enfermedad, que incluían hemorragia externa, pelo erizado, deshidratación, disminución de la actividad y aislamiento.

### ESTIMACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA EN HÁMSTER

Se estimó cuantitativamente la virulencia de cada aislado en el modelo hámster Sirio dorado (*Mesocricetus aureatus*) mediante la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) según la metodología propuesta por Fajardo y col.<sup>8</sup> Los animales control negativo fueron inoculados con los mismos volúmenes de medio EMJH estéril. Todos los aislados se evaluaron en tres experimentos independientes. El cálculo de la  $DL_{50}$  para cada cepa se realizó mediante el método de Reed y Muench.<sup>9</sup>

### PROCEDIMIENTO DE LA NECROPSIA

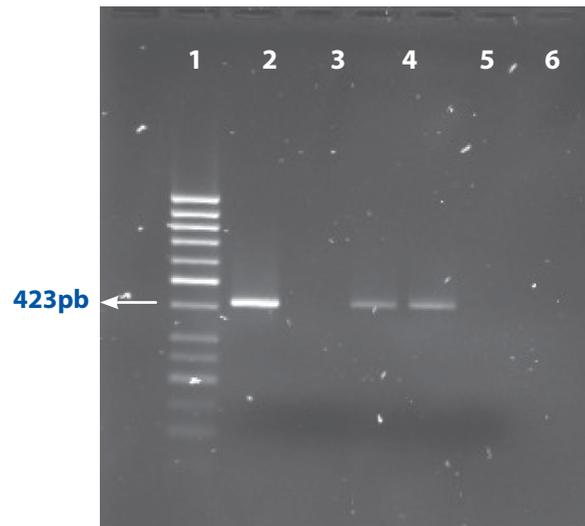
Los animales que se encontraban en condiciones precarias de salud o que llegaban al punto final de los experimentos (día 18 p.i.), se les realizó la eutanasia, inyectándoles anestésico y llevándolos luego a la cámara de  $CO_2$ . Se hace una descripción macroscópica del estado de los órganos (pulmón, hígado y riñones) y se realizan los cortes de tejido, una porción en formol tamponado y otra para macerar y sembrar en medio líquido EMJH libre de antibióticos.

### ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los cortes de hígado, riñón y pulmón conservados en formol tamponado se procesaron por técnicas histológicas convencionales. Se hizo Hematoxilina Eosina (H-E) para determinar cambios histopatológicos y adicionalmente coloración de Warthin Starry (W-S) para ver formas compatibles con *Leptospira* spp. en tejidos.<sup>10</sup>

### ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

La sangre obtenida por punción cardíaca, previo suministro de anestesia de los animales, fue centrifugada a 15.000 RPM. El suero fue conservado en congelación a  $-20^{\circ}C$ , hasta el momento del procesamiento en el Laboratorio de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES, para la evaluación de: proteína C



Gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR Green I, en el cual se muestra el producto de la amplificación con primers descritos por Levett como específicos de cepas patógenas. Línea 1, marcadores de tamaño molecular (50 bp). Línea 2, control positivo de la reacción de PCR; ADN aislado a partir de cultivo de *L. interrogans* serogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Línea 3, producto de amplificación a partir de cultivo de *L. biflexa*. Línea 4, producto de PCR obtenido de cultivo de *L. interrogans* AIM. Línea 5, producto de PCR obtenido de cultivo de *L. interrogans* JET. Línea 6, control negativo de la reacción de PCR.

**Figura 1.** Caracterización molecular de aislados colombianos de *Leptospira*, producto de PCR LipL32.

reactiva, creatinina, urea, nitrógeno ureico en sangre, fosfatasa alcalina, transaminasas (ALT/GPT-AST/GOT) y bilirrubina total y conjugada.

### CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto y todos los experimentos en los animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la SIU (sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia).

## RESULTADOS

### CASOS CLÍNICOS QUE DIERON ORIGEN A LAS CEPAS DE *Leptospira* COLOMBIANAS

#### CEPA AIM

Se obtuvo del cultivo positivo de un paciente de sexo masculino de 44 años, procedente de Medellín, con tres días de evolución de malestar general, prurito



**Tabla 1.** Resultados de las pruebas de respuesta inflamatoria (PCR) y del perfil renal al día 5 y 18 postinfección de hámster inoculados con dos cepas colombianas de *Leptospira* spp.

Prueba/ Hámster	PCR (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		BUN (mg/dL)		Urea (mg/dL)	
Valor referencia	0 – 8		0.3 – 1		12 – 25		10 -40	
Días postinfección	5	18	5	18	5	18	5	18
Control negativo	0,3	0,8	0,3	0,6	14,2	16,5	12,00	16,05
1-H-AIM-1	3,3	0,8	0,38	0,34	28,4	21,4	60,78	45,80
1-H-AIM-2	12,7	1,5	0,33	0,36	28,0	23,6	59,92	50,50
1-H-AIM-3	8,4	1,0	0,24	0,33	18,0	38,4	38,52	82,18
2-H-AIM-1	2,6	1,5	0,06	0,32	5,7	21,5	12,20	46,01
2-H-AIM-2	2,7	3,7	0,02	0,32	5,9	22,5	12,63	48,15
2-H-AIM-3	3,6	2,3	0,03	0,39	6,4	24,7	18,60	52,86
1-H-JET-1	3,6	0,3	0,14	0,28	22,9	23,7	49,01	50,72
1-H-JET-2	2,6	1,7	0,12	0,33	3,2	18,7	6,85	40,02
1-H-JET-3	6,0	2,7	0,18	0,27	19,6	19,5	41,94	41,73
2-H-JET-1	1,7	2,8	0,05	0,30	5,6	21,5	11,98	46,01
2-H-JET-2	3,3	2,9	0,18	0,33	19,6	19,8	41,94	42,37
2-H-JET-3	2,3	2,1	0,2	0,39	14,6	25,1	33,48	53,71

1: primer ensayo. 2: segundo ensayo. H1: animal con inóculo alto. H2: animal con inóculo bajo. H3: animal inoculado con suspensión a partir de los animales H1-H2. -: no se pudo hacer la determinación. AIM: aislado de paciente AIM. JET: aislado de paciente JET.

cularon dos animales con la cepa de referencia *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagie serovar. Copenhageni (donada por Fiocruz, Brasil).

Al quinto día p.i. se realizó punción cardíaca, previa aplicación de anestesia, para toma de sangre para pruebas bioquímicas; además, se hizo una suspensión diluyendo en 0,6 mL de solución salina fisiológica estéril, 0,2 mL de sangre total de cada uno de los dos hámster inoculados por aislado; esta suspensión se aplicó vía intraperitoneal en otro hámster, para, de esta manera, determinar si habían cambios en la reactivación de la virulencia.

Ninguno de los tres animales inoculados para cada uno de los aislados presentaron signos evidentes de enfermedad; mientras que el control positivo que correspondió a los animales inoculados con la cepa de *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae presentaron pérdida de la constitución corporal, aparien-

cia icterica de sus mucosas y deshidratación severa; estos murieron antes del día 5 p.i.

#### RESULTADOS DE LA NECROPSIA, ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y RECUPERACIÓN DE *Leptospira* POR CULTIVO

En la evaluación macroscópica durante la necropsia se observó que el hígado, los riñones y los pulmones tenían apariencia normal. Sin embargo, los cultivos que se realizaron a partir de hígado y riñón, en algunos de los animales, permitieron la recuperación de la bacteria. Se encuentran en fase de procesamiento los registros histopatológicos, con los cuales se pretende establecer las características de la colonización en los tejidos estudiados.

#### ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

Los resultados de los parámetros de respuesta inflamatoria, como la proteína C reactiva muestra, en la

**Tabla 2.** Resultados de las pruebas del perfil hepático al día 5 y 18 postinfección de hámster inoculados con dos cepas colombianas de *Leptospira* spp.

Prueba/Hámster	Bilirrubina total (mg/dL)		Bilirrubina conjugada (mg/dL)		ALT (UI/L)		F. Alcalina (UI/L)		AST (UI/L)	
	5	18	5	18	5	18	5	18	5	18
Valor de referencia	0,2 – 0,8		0 – 0,25		25 – 70		60 – 250		28 - 140	
Días postinfección	5	18	5	18	5	18	5	18	5	18
Control negativo	0,4	0,6	0,1	0,15	34	48	88	120	47	68
1-H-AIM-1	0,9	0,7	0,5	0,3	72	142	193	184	-	168
1-H-AIM-2	4,1	0,5	2,1	0,2	209	67	70	354	-	79
1-H-AIM-3	0,8	0,5	0,4	0,3	64	52	142	173	56	66
2-H-AIM-1	0,5	0,4	0,3	0,2	19	68	113	363	22	64
2-H-AIM-2	0,3	1,1	0,1	0,9	16	55	132	153	12	40
2-H-AIM-3	0,5	0,7	0,2	0,4	15	79	124	325	26	71
1-H-JET-1	1,2	0,5	0,7	0,2	63	55	243	230	-	28
1-H-JET-2	0,3	0,8	0,2	0,5	20	90	85	262	18	72
1-H-JET-3	0,8	0,4	0,2	0,2	54	50	240	205	30	21
2-H-JET-1	0,5	0,6	0,3	0,3	21	62	70	182	23	72
2-H-JET-2	0,9	0,6	0,4	0,2	69	54	230	197	-	30
2-H-JET-3	0,8	0,9	0,3	0,5	22	91	125	232	26	312

**1:** primer ensayo. **2:** segundo ensayo. **H1:** animal con inóculo alto. **H2:** animal con inóculo bajo. **H3:** animal inoculado con suspensión a partir de los animales H1-H2. **-:** no se pudo hacer la determinación. **AIM:** aislado de paciente AIM. **JET:** aislado de paciente JET.

mayoría de los animales, un ligero aumento al 5 día p.i con una baja significativa al día 18 p.i. En cuanto a las pruebas del perfil hepático y renal hubo variabilidad en los mismos y a pesar de encontrar algunos valores por fuera de los rangos de referencia, que nos indican afectación tanto hepática como renal, no se observa una tendencia significativa durante la evolución del proceso de infección en la mayoría de los animales (tabla 1 y 2).

## DISCUSIÓN

La tipificación molecular de los dos aislados de *Leptospira* spp., originalmente aislados de humanos, permite

demonstrar su capacidad patogénica al ser caracterizados por la amplificación del gen LipL32 encontrado sólo en especies patógenas del género. Adicionalmente, el análisis de su secuencia las ubican dentro de la especie *L. interrogans*, hecho epidemiológicamente importante, porque permite aproximarse a conocer las cepas que circulan en nuestro medio y a la caracterización de la enfermedad en Colombia.

Dada la ausencia de signos clínicos característicos de enfermedad por *Leptospira* en el modelo experimental hámster, se evidencia una disminución de la virulencia de las cepas, ya que previo a su utilización se sometieron a repiques continuos en cultivo *in vitro* para su mantenimiento; este hecho se ha documen-

tado previamente en estudios de producción de vacunas contra la leptospirosis.<sup>15,16</sup> Por el hecho de ser la primera vez que se usan aislados colombianos en un modelo experimental, en los que se desconoce su virulencia, se plantea llevar a cabo un proceso de revitalización mediante pases sucesivos en este modelo para reactivación de la virulencia de las cepas. Sin embargo, al hacer el análisis de los resultados de los biomarcadores de química clínica, observamos que a pesar de no presentar signos evidentes de enfermedad, los hallazgos paraclínicos muestran alteraciones funcionales que aunque no muy marcadas, en hígado y riñón, demuestran la capacidad patogénica de los aislados. Adicionalmente, los cultivos positivos que se obtuvieron a partir de estos tejidos en algunos animales se pueden asociar directamente con los cambios encontrados en los estudios macroscópicos y deben ser confirmados con los estudios histopatológicos que aún se encuentran pendientes. En general, estos hallazgos demuestran que aunque las cepas no pierden capacidad invasiva, sí puede disminuirse su virulencia, lo cual permite la adaptación al modelo experimental animal, un hospedero con susceptibilidad reconocida.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La caracterización molecular de los aislados colombianos nos permitió establecer la potencialidad patogénica de estos. Basados en los análisis del gen LipL32, marcador molecular de especies patógenas, concluimos que los aislados corresponden a *L. interrogans*.

Se evidencia en el modelo experimental hámster que los aislados colombianos presentan tropismo y colonización a hígado y riñones, que es lo que ocurre de forma característica en el síndrome de Weil clásico.

Es necesario llevar a cabo un protocolo de revitalización de los aislados colombianos para recuperar la virulencia y realizar estudios de caracterización inmunológica e histopatológica.

Este estudio experimental, que se encuentra en desarrollo y construcción, pretende, como propósito final, determinar la respuesta inmune en hámsteres infectados con *L. interrogans* durante la etapa aguda de la enfermedad y determinar la inmunopatología de la enfermedad en este modelo susceptible, lo cual será útil para la evaluación de vacunas y la respuesta

a distintos tratamientos más allá de la descripción clínica y patológica.

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este estudio recibió financiación del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS, Colombia (Cod 325645221265-352-2008) y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical de la Universidad CES.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 2008; 26: 3892-6.
2. Ko AI, Goarant C y Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews*. 2009; 7: 736-47.
3. Levett PN. *Leptospirosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 296-326.
4. Pereira MM, Pereira JJ, Alves M, Da Silva MF, Pelajo M, Lenzi HL, et al. Experimental leptospirosis in Marmoset Monkeys (*Callithrix Jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 13-20.
5. Ko AI, Galvao RM, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Salvador Leptospirosis Study Group*. *Lancet*. 1999; 4: 820-5.
6. Faine S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. World Health Organization; Geneva: 1982.
7. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwald AG and Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005; 54: 45-9.
8. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Estandarización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptos-

- pirosis humana. Rev Cubana Med Trop. 1998; 50: 22-6.
9. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating the fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27: 493-7.
  10. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* y leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci; 1999.
  11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162: 156-9.
  12. Vernel PF, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. Infect Immun. 2006; 74: 4172-9.
  13. Vernel PF, Goarant C. Differential Cytokine Gene Expression According to Outcome in Hamster Model of Leptospirosis. Neglected Tropical Diseases. 2010; 4: e582.
  14. World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003. [consultado 05/05/2006] Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ilspage.html/>
  15. Hernández Y, Fajardo EM, Ortíz B. Método para revitalizar las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirosis. Health IG; 1999. p. 7-11.
  16. González A, Batista N, Valdés Y, González M. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado. Rev Cubana Med Trop. 2002; 54: 32-6.