

Meny P.<sup>1</sup>, Menendez C.<sup>1</sup>, Quintero J.<sup>1</sup>, Hernandez E.<sup>1</sup>, Schelotto F.<sup>1</sup>, Rios C.<sup>2</sup>, Ifran S.<sup>1</sup>, Varela G.<sup>1</sup>, Balassiano IT.<sup>3</sup>, Vital-Brazil JM.<sup>3</sup>, Trindade CNDR.<sup>3</sup> y Ramos TMV<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Uruguay.  
<sup>2</sup> Área de Salud Pública, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay  
<sup>3</sup> Serviço de Referência em Leptospirose, Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

## INTRODUCCIÓN

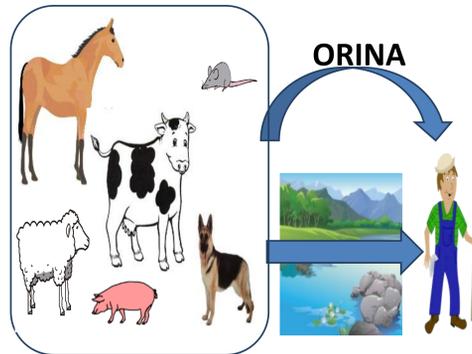
La leptospirosis es una enfermedad zoonótica ampliamente extendida, con distribución mundial, causada por espiroquetas del género *Leptospira*. En Uruguay la leptospirosis es endémica, con casos aislados y brotes esporádicos. Se estima que en país ocurren anualmente más de 500 casos humanos, principalmente infectados a partir del **reservorio bovino** y de otros animales de producción, en medio rural.

El hombre es hospedero accidental, que se infecta de forma directa a través del contacto con la piel y mucosas con orina de animales contaminados, o de forma indirecta por el contacto con agua o suelo húmedo contaminado.

En el hombre, la leptospirosis puede ser una infección asintomática, o presentarse con sintomatología inespecífica que puede confundirse con

la de otras afecciones febriles o llegar hasta una afección grave multiorgánica.

El diagnóstico se realiza habitualmente por métodos indirectos, y sólo recientemente por amplificación de ADN sobre muestras de sangre de los primeros días de enfermedad.



## OBJETIVOS

Aislar e identificar cepas humanas de *Leptospira* a partir de hemocultivos, y cepas del ambiente en que habita la población en riesgo

## METODOLOGIA

### 1. Cultivos para aislamiento:



50 ul SANGRE de los primeros días de enfermedad con EDTA en medios EMJH y Fletcher



500ul de AGUA AMBIENTAL recogida en zonas de riesgo, filtrada por 0.22um y sembrada en medio EMJH y Fletcher

Los cultivos fueron incubados en estufa a 28°C, y semanalmente fueron observados al microscopio de campo oscuro 600x.

### 2. PCR:



El DNA extraído de las muestras fue analizado en PCR tiempo final.



Los cebadores utilizados amplifican secuencias del gen *LipL32* y del gen *16S ribosomal*.

Esto nos permite distinguir leptospirosis patógenas que amplifican para *LipL32* y *16S*, de las saprófitas que solo amplifican para *16S*.

El amplicón del gen *16S* con los cebadores Lepto A y Lepto B fue secuenciado utilizando cebadores Lepto C y Lepto S4.

En muestras ambientales también se utilizaron cebadores para el gen *23S*, solo amplificado en *L. biflexa*.

**3. MLVA:** En dos de los tres aislamientos humanos que amplificaron el gen *LipL32*, se realizó la tipificación molecular obteniéndose un perfil VNTR para cada uno. Se utilizaron tres pares de cebadores para los loci VNTR 4, VNTR 7 y VNTR 10. Ellos permiten diferenciar entre cepas de *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri*.

**4. PFGE:** A los dos aislamientos humanos positivos para el gen *LipL32* e identificados por MLVA se les aplicó esta técnica. Para la digestión se utilizó la enzima de restricción NotI y *Salmonella enterica* serotipo Braenderup fue empleada como estándar de tamaños de ADN.

**5. MLST:** Los dos aislamientos humanos fueron tipificados por MLST utilizando cebadores para los genes *housekeeping*: *glmU*, *pntA*, *pfkB*, *caiB*, *mreA*, *sucA* y *tpiA*. Los productos de PCR fueron secuenciados. Se seleccionaron todos los alelos para cada gen en la base de datos [pubmlst.org/leptospira](http://pubmlst.org/leptospira) y se alinearon en el programa para secuencias múltiples MAFFT

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### • AISLAMIENTOS HUMANOS

En el período 2010-2015 se estudiaron 3 aislamientos de hemocultivos de trabajadores rurales. Fueron identificados como *Leptospira interrogans*.

-AH1 fue clasificado en serogrupo Pomona serovar Pomona y confirmado en el laboratorio de referencia para Leptospirosis de Queensland, Australia.

-AH2 y AH3 resultaron positivos para el gen *LipL32*, lo cual nos sugiere que son leptospirosis patógenas ya que la lipoproteína *LipL32* se localiza solo en la membrana externa de estas leptospirosis y es considerada como factor de virulencia en la infección del huésped.

➤ Según los perfiles VNTR obtenidos con la técnica MLVA (Salaün et al., 2006) AH2 pertenece a la especie *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewiki y AH3 a *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola o serovar Portlandvere (Tabla 1). Para este último fue imposible diferenciar entre ambos serovares del serogrupo Canicola por la técnica MLVA utilizando los cebadores anteriormente descritos.

Tabla 1. Perfil VNTR para los dos aislamientos AH2 y AH3.

Aislamiento	Número de copias para cada locus					Especie Serogrupo Serovar
	VNTR 4	VNTR 7	VNTR 10	VNTR Lb4	VNTR Lb5	
AH2	5	0	10	np	np	<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewiki
AH3	1	10	3	np	np	<i>L. Interrogans</i> Canicola Canicola/Canicola Portlandvere

np: No se obtuvo producto de PCR

➤ En PFGE los resultados fueron concluyentes para AH2, ya que el patrón obtenido coincidió con el patrón de referencia de la cepa serogrupo Pomona serovar Kennewiki, mientras que el patrón obtenido para AH3 coincidió con los patrones de referencia de los serovares Portlandvere y Canicola (ambos serogrupo Canicola) no presentando ninguna diferencia entre ellos (Figura 1). Esto no nos permitió diferenciar entre ambos serovares, por lo cual podemos únicamente afirmar que AH3 pertenece al serogrupo Canicola.

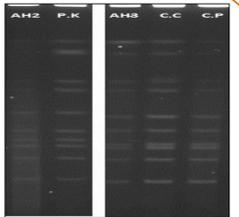


Imagen de PFGE mostrando los patrones de AH2 y AH3 frente a las cepas de referencia *L. interrogans* Pomona Kennewiki (P.K), y *L. interrogans* Canicola Canicola (C.C) y Canicola Portlandvere (C.P)

➤ Por MLST AH2 y AH3 fueron positivos para los siete genes (Figura 2), lo cual permitió continuar con el procedimiento y secuenciar cada amplicón. El análisis de las secuencias de los siete genes para cada aislamiento nos reveló dos perfiles alélicos distintos; para AH2 el ST fue 140 y para el AH3 fue 37 (Tabla 2).

Tabla 2. Sequence Type (ST) para aislamientos AH2 y AH3

Aislamiento	Número de alelo para cada gen							Número de ST
	<i>glmU</i>	<i>pntA</i>	<i>pfkB</i>	<i>caiB</i>	<i>mrfA</i>	<i>sucA</i>	<i>tpiA</i>	
AH2	3	3	4	16	5	3	3	140
AH3	3	3	4	5	5	3	3	37

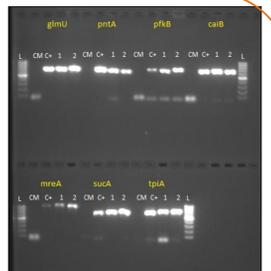


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos de la PCR tiempo final de la técnica MLST para los siete genes *housekeeping* (*glmU*, *pntA*, *pfkB*, *caiB*, *mreA*, *sucA* y *tpiA*) en los aislamientos humanos (1=AH2 y 2=AH3) CM: control de mezcla, y C+: control positivo (*L. interrogans* serovar Copenhageni)

### • AISLAMIENTOS AMBIENTALES

De las 6 cepas ambientales recuperadas, dos de ellas fueron aisladas en asentamiento de la periferia de Montevideo y tres en establecimientos rurales. Hasta el momento uno de ellos fue diferenciado del resto ya que en el procedimiento PCR con los cebadores LBi no presentó amplificación, lo cual indicó que no pertenecía a la especie *Leptospira biflexa*. Posteriormente fue caracterizado por secuenciación del segmento amplificado *16S* y su resultado fue *Leptospira meyeri*. El resto de los aislamientos ambientales junto a un cultivo de aguas de Isla de Lobos se han identificado como *Leptospira biflexa*

## CONCLUSIONES

En este período de seis años los hemocultivos realizados fueron aproximadamente 300, de los cuales siete de ellos fueron positivos por PCR *16S* y/o PCR *LipL32* y VNTR. Esto nos da un porcentaje de recuperación de un poco más de 2%. Los datos preliminares de este trabajo sugieren una diversidad de cepas circulantes, que importa relacionar con los aislamientos de origen animal, especialmente bovinos, para obtener información epidemiológica relevante en términos de prevención.