



INFORME BREVE

Diferenciación de serovares de leptospiras patógenas mediante PCR del gen *ligB* y secuenciación



Mara Leila Martínez*, Sylvia Grune Loffler, Graciela Noemi Romero y Bibiana Felicitas Brihuega

Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), INTA Castelar, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 13 de enero de 2016; aceptado el 28 de noviembre de 2016
Disponibile en Internet el 21 de octubre de 2017

PALABRAS CLAVE

Reacción en cadena de la polimerasa; *Leptospira* spp.; *LigB*

KEYWORDS

Polymerase chain reaction; *Leptospira* spp.; *LigB*

Resumen La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución mundial. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica molecular que diferencie leptospiras patógenas. Se amplificó mediante PCR y se secuenció una región de la adhesina *ligB*, presente solo en las especies patógenas. Se utilizaron los iniciadores *ligBFpet* y *ligBRpet*. Dichos iniciadores lograron amplificar el ADN blanco de 6 cepas patógenas referenciales de *Leptospira interrogans* (serovar Pomona cepa Pomona, serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, serovar Copenhageni cepa M 20, serovar Wolffi cepa 3705, serovar Pyrogenes cepa Salinem y serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo) y el de *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis cepa Castellon 3; también el de 4 cepas patógenas aisladas de bovino, porcino, rata y comadreja. En las 2 cepas referenciales no patógenas utilizadas, *Leptospira biflexa* serovar Patoc cepa Patoc I y *L. biflexa* serovar Andamana cepa Andamana, no hubo amplificación. La secuenciación de los productos amplificados expuso una suficiente variación entre los serovares estudiados, que permite diferenciarlos.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Differentiation of pathogenic leptospires spp by PCR of *ligB* gene and sequencing

Abstract Leptospirosis is a zoonosis having worldwide distribution. The objective of this work was to develop a molecular technique to differentiate pathogenic *Leptospira* spp. A region of adhesin *ligB*, present only in the pathogenic species was amplified by PCR and sequenced. *ligBRpet* and *ligBFpet* primers were used, which amplified the target DNA from pathogenic *L. interrogans* reference strains serovars Pomona strain Pomona, Canicola strain Hond Utrecht IV,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: martinez.mara@inta.gob.ar (M.L. Martínez).

Copenhageni strain M 20, Wolffi strain 3705, Pyrogenes strain Salinem, Hardjo strain Hardjoprajitmo, *L. borgpetersenii* serovar Castellonis strain Castellon 3 and 4 pathogenic strains isolated from bovines, pigs, rats and opossums. *L. biflexa* serovars Patoc strain Patoc i and Andamana strain Andamana were not amplified. Sequencing of the amplified products exhibited sufficient variation among serovars, which differentiates them

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución mundial y representa una enfermedad infecciosa potencialmente grave, causada por serovares patógenos del género *Leptospira*. En el hombre, la enfermedad causa desde un estado gripal hasta compromiso multiorgánico. En los animales de producción, en especial en bovinos y porcinos, produce grandes pérdidas económicas debido a los problemas reproductivos que ocasiona. La transmisión se produce principalmente a través del contacto con agua o con el medio contaminados con leptospira, producto de la presencia de animales domésticos portadores y animales silvestres que excretan las bacterias con la orina^{1,3}. Esta bacteria se mantiene en muchos reservorios animales, que son los que contribuyen en gran medida al mantenimiento de leptospira, por lo que esta enfermedad es difícil de erradicar, pero sí puede controlarse con medidas profilácticas adecuadas y continuas. La detección de ADN bacteriano en muestras clínicas se utiliza cada vez más y se han desarrollado varios ensayos de PCR para el diagnóstico de la leptospirosis^{2-4,6,7,10,11,13}. En la fase aguda de la enfermedad, la bacteria está presente en grandes cantidades en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo. Por lo tanto, se

puede obtener una alta sensibilidad en los ensayos de PCR cuando se toman las muestras antes del inicio de la terapia antimicrobiana^{2,11,14}.

En el presente estudio fueron diseñados iniciadores de PCR basados en secuencias conservadas de *Leptospira* spp. con el programa Primer-BLAST. Dichos iniciadores amplifican una región específica de 1.044 nucleótidos del gen que codifica la adhesina *ligB*, presente solo en las leptospiras patógenas (GenBank: AF534640.1)¹², y precisamente por tal motivo se seleccionó esta región. La expresión de *ligB* está controlada por las señales ambientales y la osmolaridad, y es necesaria para alcanzar la unión de la bacteria a las células del hospedador. Estas proteínas son factores de virulencia en las especies patógenas de *Leptospira*^{5,8,9,12}. Debido a la naturaleza altamente conservada de los genes *ligB*, es probable que la mayoría de los polimorfismos evidenciados en la secuenciación sirvan para poder discriminar entre los diferentes serovares de *Leptospira* spp.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una técnica molecular que identifique y diferencie serovares de leptospiras patógenas mediante la amplificación y la secuenciación de una región del gen de la adhesina *ligB*.

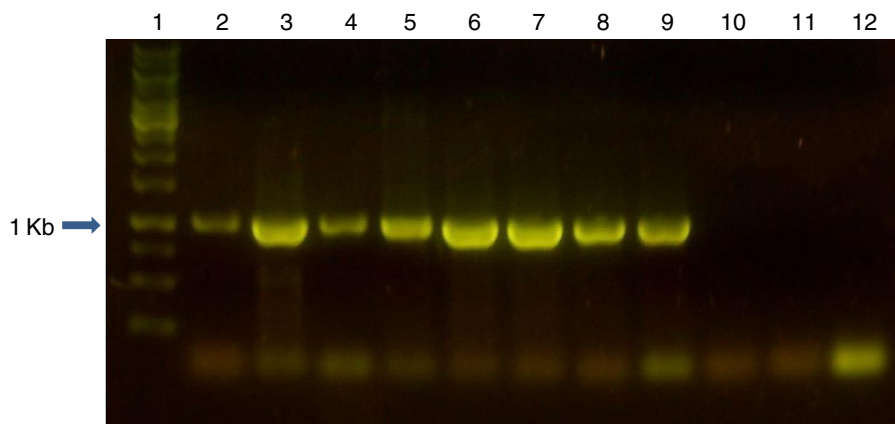


Figura 1 Gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE, mostrando los productos de PCR de 1 kb generados con los iniciadores *ligBFpet* y *ligBRpet* en las especies patógenas de *Leptospira* spp. y la ausencia de amplificación en las especies no patógenas de *Leptospira* spp. Calle 1: marcador de ADN 1 kpb (INBIO Highway, Argentina); calle 2: *L. interrogans* serovar Pomona cepa Pomona; calle 3: *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht iv; calle 4: *L. borgpetersenii* serovar Castellonis cepa Castellon 3; calle 5: *L. interrogans* serovar Wolffi cepa 3705; calle 6: *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem; calle 7: *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo; calle 8: *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20; calle 9: *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht iv aislada de una comadreja; calle 10: *L. biflexa* serovar Patoc cepa Patoc i; calle 11: *L. biflexa* serovar Andamana cepa Andamana; calle 12: control de contaminación sin templado.

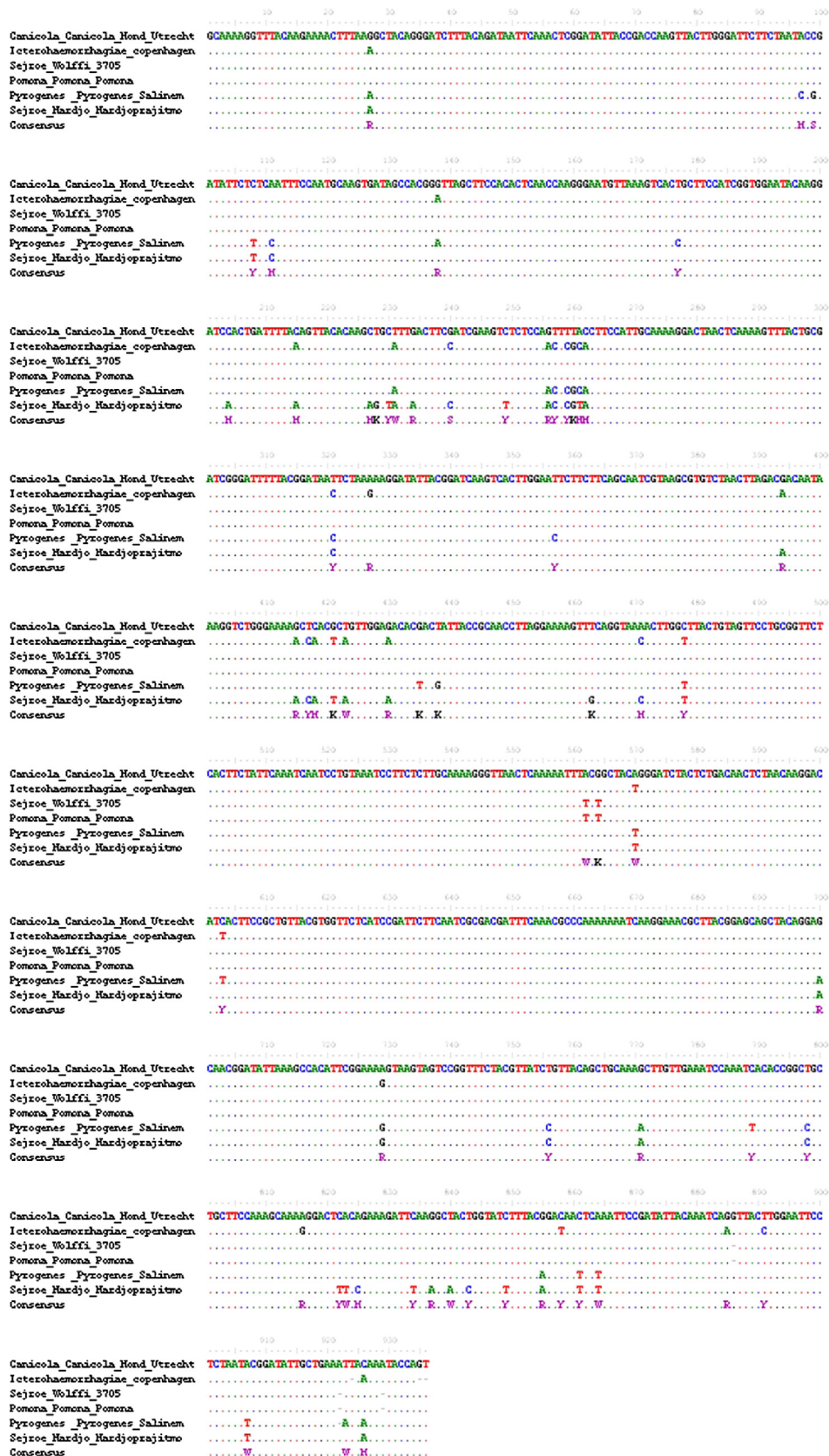


Figura 2 Alineamiento múltiple mediante ClustalW2 de las secuencias de nucleótidos obtenidas de un fragmento 1 kb del gen *ligB* de las cepas referenciales *L. interrogans* serovar Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Wolffi cepa 3705, *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem, *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo y *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20. (continúa pág. siguiente).

Se utilizaron las siguientes cepas patógenas referenciales y aislamientos de *Leptospira* obtenidos del Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina: *L. interrogans* serovar Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis cepa Castellon 3, *L. interrogans* serovar Wolffi cepa 3705, *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem, *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo y *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20; las cepas no patógenas que se emplearon fueron *Leptospira biflexa* serovar Patoc cepa Patoc I y *L. biflexa* serovar Andamana cepa Andamana. También se emplearon 4 cepas de *L. interrogans* aisladas de casos clínicos de animales: bovino (serovar Pomona cepa Pomona), porcino (serovar Pomona cepa Pomona), rata (serovar Copenhageni cepa M20) y comadreja (serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV). Para la caracterización molecular de una región del gen que codifica la adhesina *ligB* de las cepas utilizadas, se obtuvo el ADN genómico de la bacteria utilizando el método del hervido a 100 °C durante 10 min. Las amplificaciones de ADN se realizaron con los iniciadores *ligBpetF* (sentido): 5'-ATCGTTACTCCAGCAGCCTT-3' y *ligBpetR* (antisentido): 5'-GCGGATATTTACTCGATCC-3', en un termociclador MyCycler™ (Biorad Thermal Cycler, EE. UU.). El volumen de la reacción final fue de 50 µl; se utilizó Tris-HCl 20 mM pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 250 µM, 50 pmoles de cada iniciador, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, EE. UU.) y 5 µl de templado. Se incubó inicialmente a 94 °C durante 5 min, luego se sometió a 35 ciclos de amplificación, cada ciclo consistió en una etapa de desnaturalización de 30 s a 94 °C, una etapa de alineación de 30 s a 55 °C y una etapa de extensión de 1,5 min a 72 °C. Luego se sometió a una extensión final de 10 min a 72 °C.

Para la detección de los productos de amplificación, se separaron 10 µl de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EE. UU.) en solución amortiguadora TAE 1x. El gel se corrió durante 30 min a 100 v y se visualizó en un transiluminador Safe Imager (Invitrogen, EE. UU.). Una muestra se consideró positiva al revelarse una banda de 1 kb. Luego, los amplicones fueron purificados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EE. UU.), para su posterior secuenciación. La secuenciación (ambos sentidos) se llevó a cabo mediante la técnica de Sanger y electroforesis por capilares en un secuenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, California, EE. UU.) en la unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, INTA (Buenos Aires, Argentina). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas bioinformáticos BLAST y ClustalW2. Se construyó una secuencia consenso para visualizar polimorfismos de secuencia en los serovares de *Leptospira* spp. utilizando el programa BioEdit.

La amplificación por PCR de una región específica de la secuencia génica de la adhesina *ligB* mostró una única banda de 1 kb en el 100% de las cepas de leptospirosis patógenas que se evaluaron: *L. interrogans* serovar Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. borgpetersenii* serovar Castellonis cepa Castellon 3, *L. interrogans* serovar Wolffi cepa 3705, *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem, *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo y *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20 (fig. 1). En las cepas no patógenas ensayadas, que fueron *L. biflexa* serovar Patoc cepa Patoc I y *L. biflexa* serovar Andamana cepa Andamana, no hubo amplificación (fig. 1). Se controló la integridad del ADN del templado de las muestras negativas mediante la corrida en gel de agarosa al 1% y mediante PCR del gen del 16S ARNr¹⁰ (datos no publicados). En los 4 aislamientos de los casos clínicos de animales, entre los que se incluyeron diversos serovares, también hubo amplificación de una única banda de 1 kb en el 100% de los casos (fig. 1 y datos no publicados).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de los productos de PCR de las cepas referenciales *L. interrogans* serovar Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Wolffi cepa 3705, *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem, *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo y *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20 fueron analizadas y comparadas mediante BLAST con otras secuencias disponibles en el GenBank y mostraron una máxima similitud (100% identidad) con las secuencias de ADN de la adhesina *ligB* de los diferentes serovares presentes en el banco de genes. En un alineamiento múltiple de las secuencias mediante ClustalW2, la secuencia consenso obtenida con el programa BioEdit permitió visualizar diferencias entre los serovares analizados. Se pudo observar la presencia de polimorfismos, es decir, el cambio de bases (A, T, C, G) dentro de la secuencia del ADN (fig. 2).

La secuenciación de los productos de PCR de una región del gen *ligB* pone en evidencia una suficiente variación entre los serovares estudiados, que permite una diferenciación clara de los serovares de *Leptospira* spp. En el presente trabajo fueron secuenciados 6 serovares de cepas referenciales de *Leptospira* spp.; se prevé sumar mayor cantidad de serovariedades para poder ampliar la cantidad de patrones. Mediante la comparación de esta secuencia con los patrones ya estudiados es posible identificar el serovar implicado en un aislamiento.

La importancia del presente trabajo radica en que es la primera vez que se diferencian serovares de leptospirosis patógenas a partir de la comparación de secuencias del producto de amplificación de una secuencia específica de la adhesina *ligB*. El conocimiento del serovar de *Leptospira* que circula en una región determinada es de suma importancia a la hora de decidir el tipo de vacuna que se debe aplicar, dado que las vacunas comercialmente disponibles son serovar-específicas.

Continuación figura 2. Los puntos denotan homología con la secuencia de la cepa referencial *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV. Nótese el primer polimorfismo en el nucleótido número 27, las cepas *L. interrogans* serovar Pyrogenes cepa Salinem, *L. interrogans* serovar Hardjo cepa Hardjoprajitmo y *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa M 20 presentan una «A» en lugar de una «G».

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Patobiología CICVyA, CNIA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, los subsidios PICT-0618 2012 y el proyecto Nacional del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria PNSA 1115052.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140:287–96.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One.* 2009;4:e7093.
- Brihuega B, Cacchione R, Durlach R, Martino O. Leptospirosis: diagnóstico y tipificación, Asociación Argentina de Zoonosis. En: Temas de zoonosis IV. 1.ª ed. Buenos Aires: Editorial Asociación Argentina de Zoonosis; 2008. p. 221–7.
- Cerqueira GM, McBride AJ, Picardeau M, Ribeiro SG, Moreira AN, Morel V, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of *ligB* to typing leptospiral isolates. *J Med Microbiol.* 2009;58:1173–81.
- Choy HA, Kelley MM, Croda J, Matsunaga J, Babbitt JT, Ko AI, Picardeau M, Haake DA. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS One.* 2011;6:e16879.
- Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, Bulach D, Buschiazzo A, Chang YF, Galloway RL, Haake DA, Haft DH, Hartskeerl R, Ko AI, Levett PN, Matsunaga J, Mechaly AE, Monk JM, Nascimento AL, Nelson KE, Palsson B, Peacock SJ, Picardeau M, Ricaldi JN, Thaipandungpanit J, Wunder EA Jr, Yang XF, Zhang JJ, Vinetz JM. What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004403.
- Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol.* 1993;139:1691–700.
- Lin YT, Chang YF. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:443–8.
- McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, Haake DA, Ko AI, Dellagostin OA. Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol.* 2009;9:196–205.
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2219–24.
- Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes.* 2005;19:111–7.
- Pappas CJ, Picardeau M. Control of gene expression in *Leptospira* spp. by transcription activator-like effectors demonstrates a potential role for LigA and LigB in *Leptospira interrogans* virulence. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:7888–92.
- Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:361–6.
- Villumsen S, Pedersen R, Krogfelt KA, Jensen JS. Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: Improved method for DNA extraction from blood cultures. *PLoS One.* 2010;5:e12095.