Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
República de Colombia
Libertad y Orden

Corpoica
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Prosperidad para todos

Genotipificación de aislamientos Colombianos de *Leptospira* spp.

Ligia Torres Higuera[1], José Luís Rodríguez Bautista[2], Sabrina del Carmen Jiménez[3], Rocio Esperanza Patiño Burbano[4]
[1]Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá. ltorres@corpoica.org.co, [2]Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá. jlrodriguez@corpoica.org.co
[3]Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá. sjimenez@corpoica.org.co, [4]Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá rpatino@corpoica.org.co

Introducción

La leptospirosis causada por *Leptospira* es una enfermedad de importancia en salud humana y salud animal, debido a los trastornos reproductivos que produce principalmente en bovinos y porcinos. El género *Leptospira* conformado por 20 genomoespecies es heterogéneo intermedias, con especies patógenas y saprófitas. Basado en el análisis filogenético del gen *16S, Leptospira* spp. comprende tres grupos filogenéticos: patógenas, intermedia y saprófitas (Fenner, 2010). Cada grupo posee diversos serovares, que son considerados como el taxón básico de este género para el monitoreo diagnóstico y estudios epidemiológicos (Cerqueira, 2009). Existen dos sistemas de clasificación para el género de *Leptospira*: el originado en la reactividad serológica y el de la clasificación genética que replanteó la taxonomía del género permitiendo una clasificación más completa de este microorganismo (Cerqueira, 2009).

Objetivo

Clasificar los aislamientos de *Leptospira* que pertenecen al Banco de germoplasma de microorganismos de interés en salud animal, bacterias y virus (BGSA-BV) de CORPOICA para identificar especie, grupo de patogenecidad, serovar y variantes genéticas dentro de estos aislamientos.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 19 aislamientos de *Leptospira* de origen humano, porcino, roedores y ambiental, identificadas previamente por pruebas fenotípicas (morfología, requerimiento de 8 azaguanina, producción de oxidasa), como especies del género *Leptospira* y 10 cepas de referencia donadas por el INTA-Argentina. Los aislamientos fueron cultivados en medio líquido EMJH y la extracción de ADN se realizó por fenol cloroformo. La amplificación de la región *16S* del ADNr se hizo por PCR, utilizando iniciadores universales externos (Morey, 2006; Janda, 2007). Los 19 productos de PCR, fueron clonados utilizando un Kit comercial TOPO TA 4 Cloning® (Invitrogen) y el ADN plasmídico fue secuenciado. Las secuencias del *16S* ADNr fueron alineadas y comparadas con las bases de datos del GenBank, usando el algoritmo BLASTn-Basic Local Alignment para la construcción de los árboles filogenéticos. Para la Ribotipificación se utilizó la enzima de restricción EcoRV, el polimorfismo fue evidenciado por Southern Blot utilizando sondas marcadas, homólogas a secuencias de ADN del gen *16S* ADNr y la detección se realizó por quimioluminiscencia (Kositanont *et al.,* 2007).

Resultados y Discusión

El producto de amplificación por PCR de la región del *16S* del *ADNr* de los aislamientos y de las cepas de referencia, mostraron un fragmento de aproximadamente 1500pb. La secuencia de la región 16S *ADNr* clasificó los aislamientos por patogenicidad en tres grupos. 10 aislamientos fueron agrupados como especies patógenas, 8 se situaron en el grupo de patogenicidad intermedia, estando mas cerca de las especies patógenas que de las saprófitas, 1 aislamiento se clasificó como saprofito. (Figura 1).

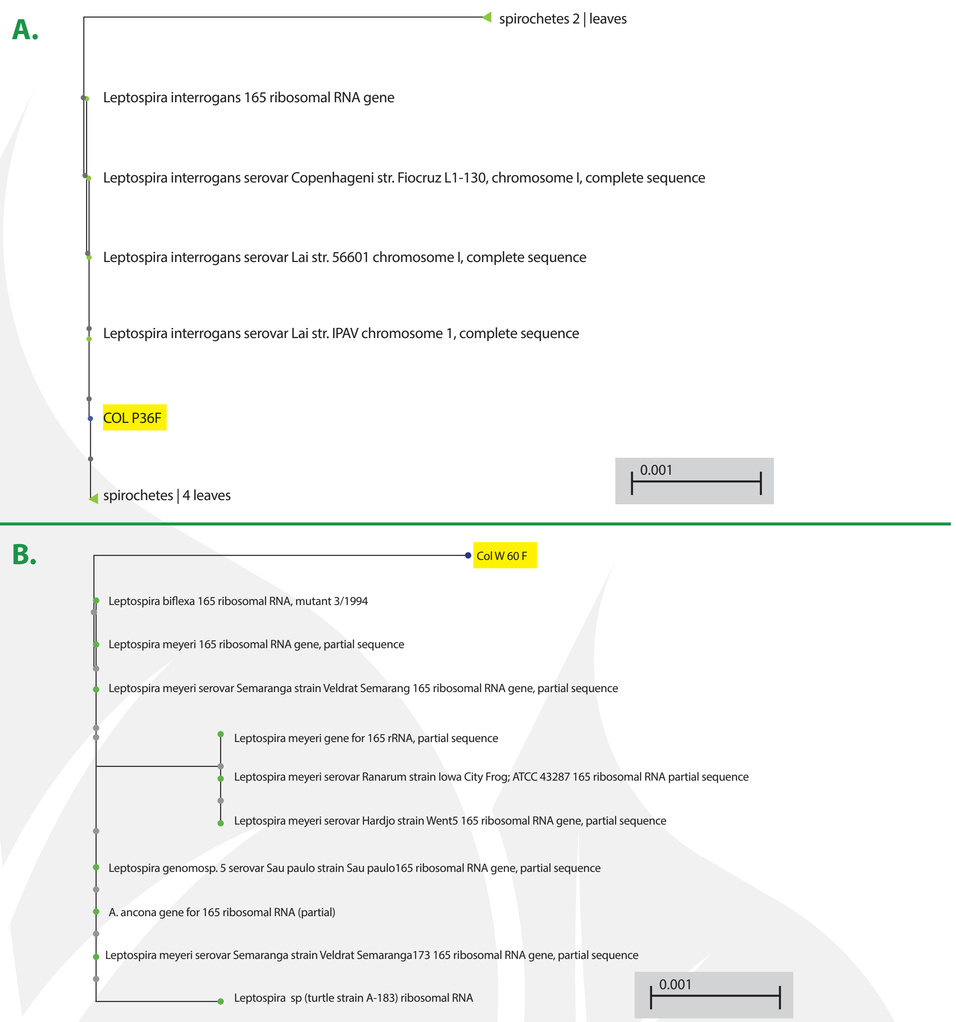

Figura 1. Análisis filogenético. **A**: Aislamiento de *Leptospira* relacionado filogenéticamente dentro del grupo saprófito; **B**: Aislamiento de *Leptospira* relacionado filogenéticamente dentro del grupo patógeno.

La Ribotificación mostró diferentes patrones para las cepas de referencia pertenecientes a los serovares: Pomona, Tarassovi, Wolffi, Pyrogenes, Hardjo, Grippotyphosa, Canicola, Ballum, Icteroahemorragiae y serovar Patoc.

En los aislamientos se encontraron tres ribopatrones: un perfil coincidió con la cepa de referencia saprófita serovar Patoc, otro perfil fue similar a la cepa de referencia patógena serovar pyrogenes y fue encontrado en 10 aislamientos y un tercer perfil no coincidió con ninguna de las cepas de referencia analizadas y se presentó en ocho aislamientos, posiblemente se trate de accesiones que por análisis filogenéticos, fueron agrupados dentro de *Leptospiras* de tipo intermedia, en las cuales su patogenicidad se encuentra todavía en estudio (Cerqueira, 2009). (Figura 2).

El análisis filogenético del gen *16S* permitió clasificar los aislamientos dentro de las especies reconocidas hasta el momento y definir el estatus de patogenicidad. Por otro lado, la ribotificación permitió confirmar estos resultados y discriminar variantes genéticas, sin embargo, no se observó mucha heterogeneidad dentro de los aislamientos analizados.

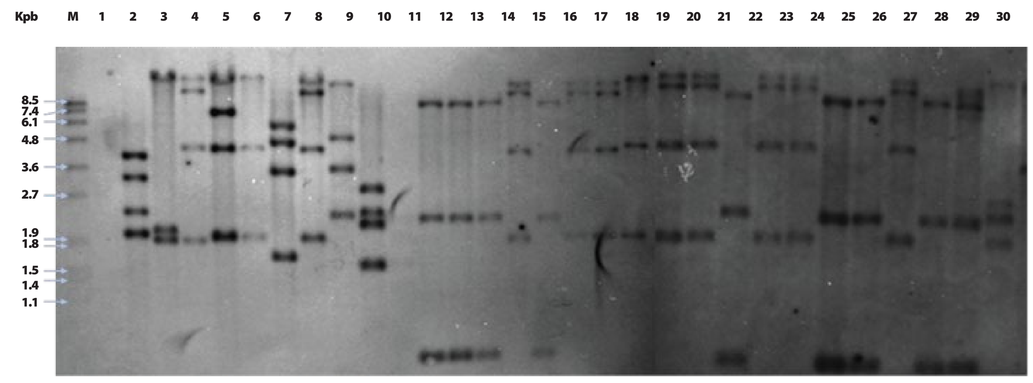

Figura 2. M: Marcador VII DIG labeled (Roche), 1 - 10: cepas de referencia 1: L. Icterohaemorrhagiae, 2: L. Tarassovi, 3: Wolffi, 4: Pyrogenes, 5: Pomona, 6: Hardjo, 7: Grippotyphosa, 8: Canicola, 9: Ballum, 10: Patoc; 11: Control; 12 - 30: aislamientos de Leptospira. Perfil I-saprófita: 30, Perfil II-pyrogenes: 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 29; Perfil III: 12, 13, 14, 16, 22, 25, 26, 28.

Referencias Bibliográficas

Cerqueira G, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. ***Journal of infection, genetics and evolution*** 2009; 9, 760-768.

Fenner S, Anjum M, Randall L, Pritchard G, Wu G, Errington J, Dalley C, Woodward M. Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. ***Research in Veterinary Science*** 2010; 89, 48–57

Janda J, Abbott S. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. ***Journal of clinical microbiology*** 2007; 45 (9): 2761-2765.

Kositanont U, Chotinantaku K, Phulsuksombati D, Tribuddharat C. Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. ***Journal of Microbiological Methods*** 2007; 69: 288–297

Morey RL, Galloway SL, Bragg AG, Steigerwalt LW, Levett PN. Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA Gene Sequencing. ***Journal of clinical microbiology*** 2006; 44 (10): 3510-3516.

Código de agenda: xxxx
CUI: xxxx