

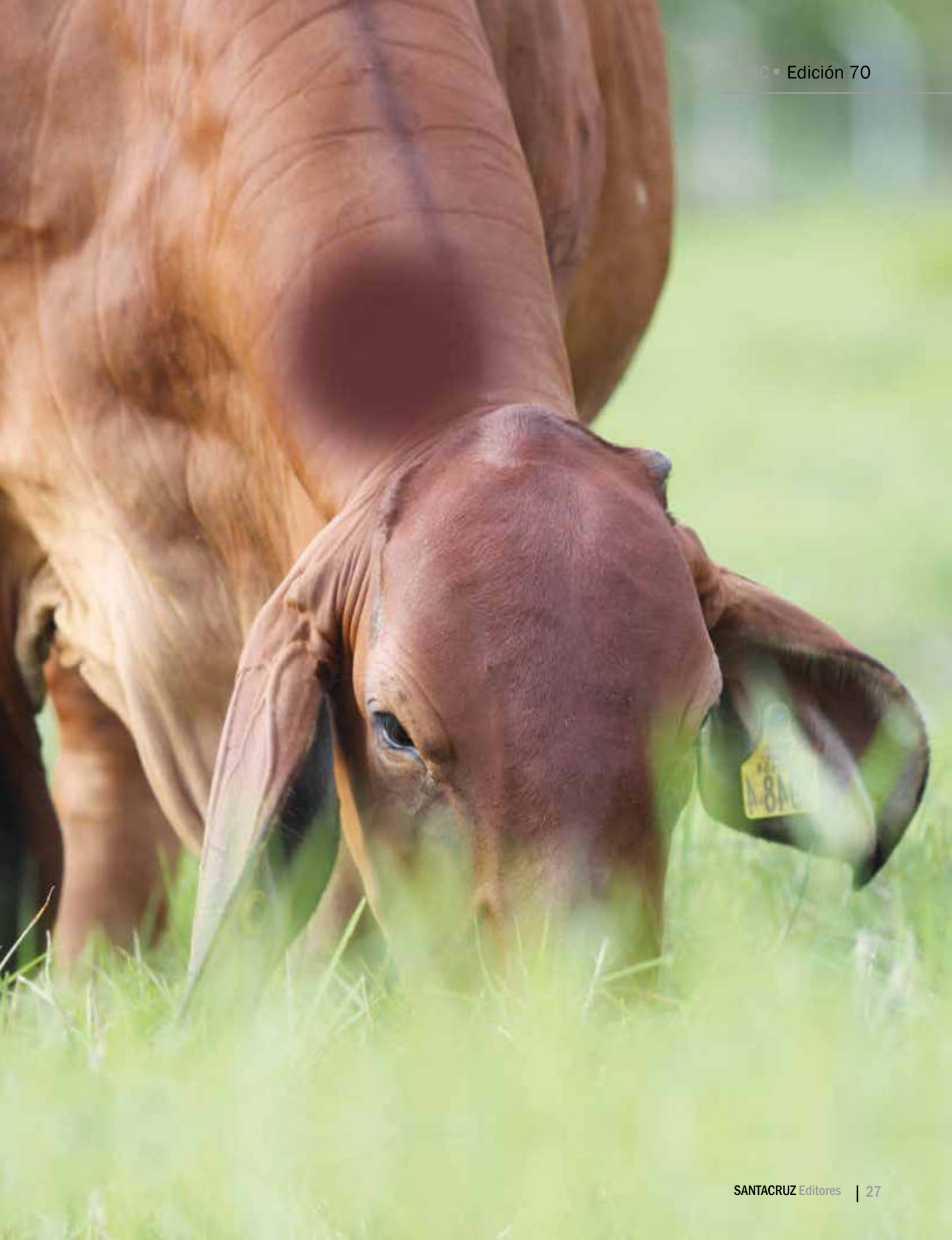
Variabilidad genética de la *Leptospira* en bovinos de *carne* y *doble propósito*

Elizabeth Regina Cassalett-Bustillo,¹

Rocío Esperanza Patino-Burbano,²

José Luis Rodríguez-Bautista,³

José Luis Parra-Arango⁴



La *Leptospirosis* es una enfermedad zoonótica con altas tasas de morbilidad y mortalidad en humanos y animales causada por una espiroqueta que se encuentra en el medioambiente y una amplia gama de animales (Díaz et al. 2011; Organización Mundial de Sanidad Animal 2008). La bacteria genera trastornos reproductivos en los bovinos y porcinos y está clasificada en subgrupos y serovares determinados por sus funciones antigénicas (Zuluaga 2009).

El género *Leptospira* está dividido en especies patógenas y saprófitas con 20 genoespecies, basado en el estudio del gen 16S; a su vez, se han dividido en tres grupos filogenéticos: patógenas, intermedias y saprofitas, y cada uno de ellos está conformado por diferentes serovares, considerados de importancia para monitoreo diagnóstico y epidemiológico (Fenner et al. 2010; Cerqueira y Picardeau 2009).

En estudios epidemiológicos realizados en el país (Díaz et al. 2011) se examinaron serológicamente 2.140 sueros bovinos del Eje Cafetero y se encontró que 681 muestras (32 %) resultaron positivas al serovar *L. hardjo*; 390 muestras (18,2 %), al serovar *L. icterohaemorrhagiae*; 207 muestras (9,6 %) al serovar *L. pomona* y 182 (8,5 %) al serovar *L. canicola*.

Evidencias serológicas y aislamientos realizados en el país, indican que *L. hardjo* tiene importancia epidemiológica en los bovinos de los Llanos Orientales con prevalencias del 63,5 %, en hatos del Valle del Cauca, con el 80,9 % y en la costa Caribe, con el 89,1 %. Así mismo, estudios de las regiones Caribe, Piedemonte Llanero y Andina mostraron prevalencias de *Leptospirosis* serovar *L. hardjo* del 32,8 %, 24,8 % y 14,4 %, respectivamente, con un promedio para el país del 21,7 %.

El objetivo de este trabajo fue clasificar aislamientos de campo de *Leptospira* a través del análisis filogenético y de los ribopatrones basados en el polimorfismo generado por los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), utilizando como marcador molecular el gen 16S ADN_r, con el fin de poder identificar especie, grupo de

patogenicidad, serovar y variantes genéticas dentro de estos aislamientos.

Materiales y métodos

Las ecorregiones escogidas para desarrollar el trabajo fueron Valles Interandinos, Costa Caribe y Piedemonte Llanero. Se tomaron 140 muestras de riñón y 20 de orina de bovinos, directamente de vejiga, en cinco mataderos ubicados en Zipaquirá (*Cundinamarca*), Ibagué-Espinal (*Tolima*), Guamal (*Meta*) y Ciénaga de Oro (*Córdoba*). Así mismo, se obtuvieron 367 muestras de orina por micción espontánea en 11 hatos bovinos ubicados en el Altiplano Cundiboyacense (3), Tolima (2), Córdoba (2), Meta (2) y Casanare (2). Para el trabajo de toma de muestras, se utilizaron dos formatos de toma de información en campo y, para los aislamientos, se implementaron los protocolos de aislamiento de *Leptospira* a partir de riñón y de orina que hacen parte del Banco de Germoplasma de Microorganismos, Virus y Bacterias de *Colombia*, actualmente *Agrosavia*.

En la planta de sacrificio, se retiró el riñón completo y se transportó sin refrigeración a un sitio de menor contaminación; el área de extracción de la muestra se esterilizó con una espátula caliente y ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Se sembró en medio líquido *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) y después de 48 horas de incubación a 30 °C, se tomaron 3 ml del cultivo inicial que fue filtrado a través de un filtro milipore (0,22 µm) a un medio semisólido con 0,1% de agar. La incubación a 30 °C se mantuvo hasta por 90 días, tiempo en el cual se descartó como negativo o se determinó como positivo, al observar la aparición de un anillo en la porción media del tubo, indicativo de crecimiento de *Leptospira* spp.

El aislamiento de *Leptospira* spp., a partir de orina recolectada de micción espontánea o directamente de vejiga de animales sacrificados, se realizó pasando 3 ml de la orina a través de un filtro milipore (0,22 µm) y sembrado en medio semisólido *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) con 0,1% de

agar a 30 °C. Se revisaron los cultivos cada 8 días para observar el crecimiento y verificar que no existiera contaminación. Si se contaminaban, el cultivo era filtrado con membrana de 0,22mm y llevado nuevamente a incubación a 30 °C, hasta observar o no el crecimiento de *Leptospira* por un lapso no mayor a 90 días.

Para el análisis filogenético, a los aislamientos se les realizó extracción de ADN por el método de fenol cloroformo, de acuerdo al protocolo Extracción de ADN para bacterias del género *Leptospira* Código IN-R-104. La amplificación de la región 16S del ADN_r fue realizada por PCR (protocolo código IN-R-107), utilizando iniciadores universales externos (Morey et al. 2006; Janda y Abbott 2007).

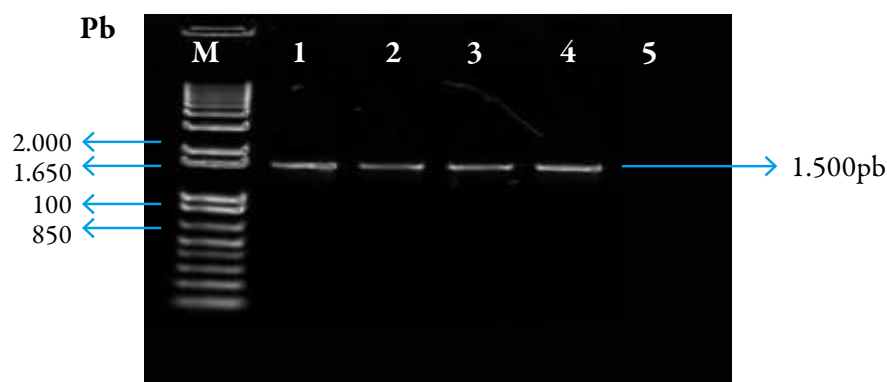
Los productos de PCR fueron clonados, utilizando un kit comercial TOPO TA 4 Cloning® Kit (*Invitrogen*) y el ADN plasmídico fue secuenciado. Las secuencias del 16S ADN_r fueron alineadas y comparadas con las bases de datos del GenBank, usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para la construcción de los árboles filogenéticos. Para la ribotipificación, se utilizó la enzima de restricción *EcoRV*; este polimorfismo fue evidenciado por Southern Blot, utilizando sondas marcadas, homólogas a secuencias de ADN del gen 16S ADN_r y el proceso de detección fue realizado por quimioluminiscencia.

El análisis de la secuencia del gen 16S ADN_r de los aislamientos de *Leptospira* permitió la identificación de especie y clasificarlos dentro de los tres grupos de patogenicidad previamente establecidos: patógeno, saprofito e intermedio. Este análisis se realizó con los siguientes criterios:

- **Porcentaje de cubrimiento:** por medio del cual se determina el porcentaje de homología entre la secuencia problema y las reportadas en las bases de datos.

- **Porcentaje de identidad:** por medio del cual se determina el grado de identidad que existe entre la secuencia problema y las reportadas en las bases de datos. Los porcentajes por debajo

Figura 1. M: Marcador de ADN 1 kb Plus. 1. Lep 091; 2. Lep 092; 3. Lep 093; 4. Lep 094; 5. Control negativo de reacción.



Fuente: Elaboración propia

de 95 % no fueron tenidos en cuenta, puesto que cepas con menor porcentaje de identidad en las secuencias de la región del gen 16S *ADNr* es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie.

- **Valor E (E-Value):** por medio del cual se determina la probabilidad de que el resultado obtenido sea el más acertado

Resultados y discusión

Una vez realizado el seguimiento bacteriológico, se determinaron 69 aislamientos como sospechosos, los cuales fueron sometidos a pruebas de *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* amplificando el gen 16S del *ADNr*, para analizar si estas espiroquetas están agrupadas en un ancestro común de protospiroqueta, como lo determinan Paster et al. (1991). Se obtuvieron cuatro productos de amplificación de la región del 16S del *ADNr* (figura 1), que mostraron un fragmento cuyo tamaño fue aproximadamente de 1.500 pb. Así se determinó la presencia de *Leptospira* spp., en esos aislamientos, lo que confirma la sensibilidad y especificidad de la prueba, de esta manera se concordó con lo obtenido anteriormente por varios investigadores que amplificaron el gen 16S (Grimont y Grimont 1986; Paster et al. 1991; Cerqueira y Picardeau 2009; Torres et al. 2013; Romero-Vivas et al. 2013).

Los aislamientos que amplificaron a *Leptospira* pertenecían a los departamentos del Meta y Cundinamarca,

según se describe en la (tabla 1). Se confirmó que en Colombia, al igual que en otros países como Brasil, India y Nicaragua, existe circulación de cepas de *Leptospira* spp., en el sistema de producción bovino (Moreno y Agudelo-Flórez 2010). Estos aislamientos de *Leptospira* en las dos zonas del país, son determinantes para estudios de respuesta inmunológica, dada la característica de patogenicidad de las especies encontradas.

El análisis de secuencia de la región 16S *ADNr* de los cuatro aislamientos de *Leptospira* permitió su clasificación en dos grupos de patogenicidad (tabla 2). Según los resultados obtenidos del análisis filogenético de este gen, tres aislamientos fueron agrupados dentro de las especies patógenas y uno se relaciona filogenéticamente dentro del grupo de *Leptospiras* que presentan una patogenicidad de tipo intermedia; es importante destacar que los árboles filogenéticos de estos aislamientos muestran mayor cercanía con las

especies patógenas que con las saprófitas (Postic et al. 2000).

En la *ribotificación* se obtuvieron *ribopatrones* de cuatro aislamientos de *Leptospira* y cinco cepas de referencia con mayor identidad (*serovares Vu-ghia, Hurstbridge, Copenhageni y Lai*); el análisis de estos *ribopatrones* mostró la presencia de dos perfiles predominantes dentro de los cuatro aislamientos (tabla 2). Un perfil coincidió con la cepa de referencia intermedio y otro perfil fue similar a la cepa de referencia patógena *serovares Copenhageni y Lai*. La patogenicidad del aislamiento que, por análisis filogenético fue agrupado dentro de las *Leptospiras* de tipo intermedia, se encuentra todavía en estudio (Cerqueira y Picardeau 2009, Torres et al. 2013; Moreno y Agudelo-Flórez 2010).

El aislamiento de cepas de carácter intermedio cobra gran importancia, dado que no se sabe el patrón de comportamiento inmunológico ante un huésped, lo que podría generar respuestas variables ante la presencia de este tipo de especies, lo que hace más complejos los estudios epidemiológicos.

Con los resultados obtenidos del análisis de las secuencias del gen 16S *ADNr* se procedió a construir los árboles filogenéticos que reflejan de forma esquemática (figura 1) el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas utilizando el algoritmo *Blast* y el método de clústers *UPG-MA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages)*. El método evidenció mayor parentesco entre los aislamientos Lep093 y Lep094, estando, a su vez, estos dos más alejados

Tabla 1. Aislamientos de *Leptospira* spp. que amplificaron por prueba de PCR región 16S *ADNr*

Aislamiento	Departamento-municipio	Identificación	Sitio de muestreo
Lep 091	Meta-Guamal	Riñón N° 15	Matadero
Lep 092	Cundinamarca-Lenguazaque	5610	Finca La Vuelta al Río
Lep 093	Cundinamarca-Zipaquirá	Riñón N° 4	Matadero
Lep 094	Meta-Castilla la Nueva	9022	Finca San Francisco

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Secuencias de los diferentes aislamientos de campo de *Leptospira* spp. en Colombia

Aislamiento	Especies con las de mayor identidad	Subgrupo de patogenicidad
Lep 091 (Col-B-70)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leptospira noguchii</i> strain CZ 214 K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence • <i>Leptospira weilii</i> serovar Vughia strain LT 89-68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 	Patógeno
Lep 092 (Col-B-71)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge strain BKID 6 serovar Hurstbridge 16S ribosomal RNA gene, partial sequence • <i>Leptospira broomii</i> partial 16S rRNA gene, SSI 5402-98 	Intermedio
Lep 093 (Col-B-72)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Copenhageni</i> str. Fiocruz L1-130. Strain Fiocruz L1-30 16S ribosomal • <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Lai</i> str. 56601 strain 56601 ribosomal RNA gene, complete sequence 	Patógeno
Lep 094 (Col-B-73)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Copenhageni</i> str. Fiocruz L1-130. Strain Fiocruz L1-30 16S ribosomal • <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Lai</i> str. 56601 strain 56601 ribosomal RNA gene, complete sequence 	Patógeno

Fuente: Elaboración propia

de los Lep091 y Lep092, con un porcentaje de cubrimiento en todos los casos del 99 y 100 % (figura 2). El resultado del árbol filogenético de estos aislamientos mostró efectivamente lo que se esperaba: mayor acercamiento de los Lep093 y Lep094, dado que estos tenían mayor afinidad por las especies *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* y *Leptospira interrogans* serovar *Lai*, como también mayor distanciamiento del Lep091 que tiene mayor afinidad con la *Leptospira noguchii* y *Leptospira weilii* serovar *Vughia*. El aislamiento del grupo intermedio se encuentra más cercano a los Lep093 y Lep094 (*L. interrogans*), lo que permite inferir que posiblemente su comportamiento ante un huésped podría ser más hacia patógeno que saprofítico.

Los análisis filogenéticos de especies de *Leptospiras*, basados en secuencias comparativas del gen 16SADNr, permiten confirmar lo asegurado previamente (Paster et al. 1991; Schmid et al. 1986; Matthias et al. 2008), sobre la posibilidad de identificar tres grupos basados en el estatus de patogenicidad (patógeno, saprofítico e intermedio), donde el propósito taxonómico de los marcadores genera resultados consistentes en obtener secuencias del gen 16S ADNr, agrupados en un árbol filogenético.

Así mismo, la agrupación de las bacterias por ribotipificación es frecuentemente usada para propósitos taxonómicos y caracterización de subgrupos de microorganismos de diferentes especies de *Leptospira* (Grimont y Grimont 1986). Lo importante del uso de estas herramientas moleculares es poder clasificar adecuadamente los microorganismos de interés en salud pública con el fin de tomar medidas profilácticas y curativas adecuadas.

Conclusiones

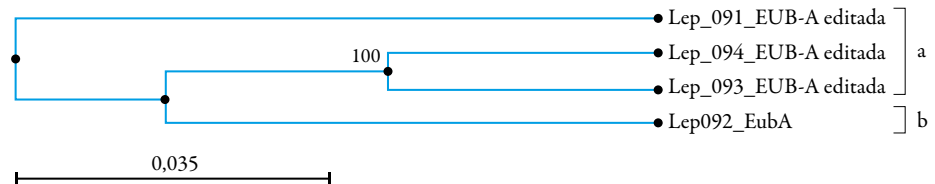
El uso de la ribotipificación de las especies de *Leptospira* spp., circulantes en el sistema de producción bovino es una herramienta primordial y fundamental para las entidades de control sanitario y para los profesionales clínicos, que manejan el diagnóstico de la *Leptospira* spp., como causal de problemas reproductivos. El análisis filogenético del gen 16S permitió clasificar los aislamientos dentro de las especies reconocidas hasta el momento y definir su estatus de patogenicidad.

La ribotipificación permitió confirmar estos resultados y discriminar variantes genéticas; sin embargo, no se observó heterogeneidad dentro de los aislamientos analizados. Los métodos de análisis filogenético y ribotipificación son complementarios para la identificación de aislamientos patógenos de *Leptospira* provenientes de diferentes fuentes. ■

1. MSc, Universidad Nacional de Colombia. Investigadora máster, Corpoica. Villavicencio, Colombia.
2. MSc, Pontificia Universidad Javeriana. Investigador máster, Corpoica. Mosquera, Colombia.
3. MSc, Washington State University. Investigador máster, Corpoica. Mosquera, Colombia.
4. MSc, Universidad Nacional de Colombia. Investigador máster, Corpoica, Villavicencio, Colombia. Estudio de variabilidad genética en aislamientos de *Leptospira* spp., en sistemas bovinos de carne y doble propósito. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(2):229-236.

Estudio de variabilidad genética en aislamientos de *Leptospira* spp., en sistemas bovinos de carne y doble propósito. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(2):229-236.

Figura 2. Análisis filogenético. a. Aislamiento de leptospira relacionado filogenéticamente dentro del grupo patógeno; b. Aislamiento de leptospira relacionado filogenéticamente dentro del grupo intermedio.



Fuente: Elaboración propia