DIFERENCIACIÓN DE Leptospira spp *POR PCR*

S. Martínez,[1] C. Fernández,[1] M. Camacho[1] y C. Duarte[2]

[1]*Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, apto. 10 San José de las Lajas, La Habana, Cuba.* [2]*Centro Nacional de Epidemiología y Diagnóstico veterinario.*

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad ampliamente distribuida que afecta a los animales y al hombre, siendo frecuentemente mal diagnosticada por lo tanto, el diagnóstico se fundamenta mas en los ensayos de laboratorio que solamente en los síntomas clínicos. Los métodos que más se utilizan se basan en la respuesta serológica aunque en, ocasiones nos brinda respuestas falseadas,de ahí la necesidad de establecer sistemas de diagnósticos alternativo como la hibridación de ácidos nucléicos (1) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (2). En este trabajo se utiliza un sistema de PCR para la diferenciación de cepas patógenas y no patógenas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron cepas de referencia y 25 cepas aisladas en Cuba. Los cebadores utilizados fueron tomados de la literatura (4), a partir de la región 16s rRNA de *Leptospira interrocrans* serovar canícola cepa Moulton. Las muestras fueron procesadas utilizándose diluciones seriadas en base 10 y posteriormente hervidas durante 5 minutos y enfriadas rápidamente en hielo,utilizando 5 µL de la muestra para la reacción. El volumen de la reacción de PCR fue de 50 µL. Las reacciones se realizaron en un equipo REACTOR THERMAL-HYBAID y un programa de 31 ciclos. El estudio del producto de amplificación se realizó mediante una hibridación de los productos amplificados con un oligonucleotido complementario a esta región.

Resultados y Discusión

Los cebadores utilizados fueron específicos pudiendo diferenciar los grupos de especies patógenas (*L. interrogans*) de aquellos grupos no patógenos (*L. biflexa*), lográndose la amplificación de la banda de 331 pb solo en las patógenas. Cuando se realizó la hibridación de los productos amplificados se pudo verificar la especificidad de la reacción de amplificación, puesto que las muestras positivas mostraron señales en la hibridación no así las que fueron negativas por PCR. En muestras de orina y leche de bovino contaminadas experimentalmente se obtuvo amplificación hasta una dilución de 10^2 a 10^3 leptospiras, lo cual es adecuado para el diagnóstico clínico. Este resultado indica que PCR es más sensible que los cultivos microbiológicos, como reportan otros autores (2).

Si se tiene en cuenta la necesidad de contar con métodos de detección rápidos del microorganismo, necesarios en esta enfermedad de difícil diagnóstico microbiológico así como lo controvertido de la serología; el contar con técnicas de alta sensibilidad y especificidad es un elemento de gran valor, sumándosele que a partir de la utilización de estas técnicas pueden implementarse trabajos de epidemiología molecular basados en los estudios de polimorfismo entre cevas que brindan una mayor información a los investigadores junto con la hibridación de ácidos nucleicos y los estudios de secuencias (4). A partir de este trabajo podemos decir que el PCR es un método promisorio en la detección temprana de la leptospirosis en el hombre y los animales.

1. Terpstra W. J.*et al.* J. Med. Microbiol. 1986;22:23-28.
2. Gravekamp C. *et al.* In Leptospirosis. Proceedings of the Leptospirosis Research Conference 1990. 151-164. Edited by Y. Kobayashi. Tokyo: University of Tokyo Press;1991.
3. Hookey JV FEMS Microbiology Letters 1992;90:267- 274.
4. Gravekamp C. *et al.* J. of Gen. Microbiology 1993;139:1691-1700.