

Evaluación de métodos de extracción de ADN genómico para la identificación de *Leptospira* spp en muestras de orina bovina mediante por PCR

Evaluation of genomic DNA extraction methods for the identification of *Leptospira* spp. in bovine urine samples by PCR

Alexandra Revelo R.^{1,2,6}, Euclides De La Torre M.², Galo Martínez C.⁵,
María Baquero C.¹, Yveth Casart Q.^{3,4}

RESUMEN

El presente estudio tuvo la finalidad de seleccionar un protocolo de extracción de ADN de *Leptospira* spp a partir de muestras de orina para el diagnóstico de leptospirosis bovina mediante PCR. Se utilizaron tres métodos de extracción de ADN: Etanol-Hidróxido de Sodio (EtNa), resina quelante Chelex® 100 y el estuche de extracción comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit. El ADN extraído sirvió para la estandarización de tres protocolos de PCR para la identificación de los genes *rrl*, *hap1* y *rrs*, respectivamente en el laboratorio de AGROCALIDAD, Ecuador. Se colectaron 72 muestras de orina bovina procedentes de ganaderías de la provincia de Manabí, Ecuador. Se obtuvieron 10 muestras positivas mediante la amplificación del gen *rrl*, el cual identifica al género *Leptospira*. De las muestras positivas a género, ocho amplificaron para el gen *hap1*, el cual codifica para la principal proteína de membrana externa de especies patógenas. Se evaluó la concordancia entre los métodos de extracción de ADN con Chelex-100, y el estuche de extracción comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit, determinándose una concordancia de 0.74 mediante el índice Kappa.

Palabras clave: leptospirosis, zoonosis, diagnóstico, extracción de ADN, Chelex, PCR

¹ Facultad de Medicina y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

² Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario AGROCALIDAD, Tumbaco, Ecuador

³ Proyecto Prometeo, SENESCYT, Ecuador

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁵ Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guayaquil, Ecuador

⁶ E-mail: paolarevelo494@gmail.com

Recibido: 30 de noviembre de 2018

Aceptado para publicación: 21 de febrero de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The purpose of this study was to select for the extraction of DNA from *Leptospira* spp from urine samples for the diagnosis of bovine leptospirosis by PCR. Three methods of DNA extraction methods were used: Ethanol-Sodium Hydroxide (EtNa), Chelex® 100 chelating resin and the PureLink® Genomic DNA Mini Kit commercial extraction case. The extracted DNA served for the standardization of three PCR protocols for the identification of the *rrl*, *hap1* and *rrs* genes, respectively, in the AGROCALIDAD, Ecuador laboratory. A total of 72 bovine urine samples were collected from livestock farms in the province of Manabí, Ecuador. Ten positive samples were obtained by amplifying the *rrl* gene, which identifies the genus *Leptospira*. Of the genus-positive samples, eight amplified for the *hap1* gene, which codes for the main outer membrane protein of pathogenic species. The agreement between the DNA extraction methods was evaluated with Chelex-100, and the PureLink® Genomic DNA Mini Kit, determining a agreement of 0.74 using the Kappa index.

Key words: leptospirosis, zoonosis, diagnosis, DNA extraction, Chelex, PCR

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial (Pacheco, 2015), siendo *Leptospira* spp el agente causal de esta patología, principalmente en regiones tropicales (Picardeau *et al.*, 2014), donde la temperatura y la humedad ambiental son adecuadas para su supervivencia (Céspedes, 2005). Los miembros de esta familia son bacterias helicoidales, de gran motilidad debido a la presencia de un motor flagelar en cada extremo (Cameron, 2015), característica que permite identificarlas con un microscopio de campo oscuro (Raddi *et al.*, 2012).

El género *Leptospira* presenta 35 especies (Thibeaux *et al.*, 2018), las cuales a su vez se dividen en tres clados evolutivos: patógenos (13 especies), saprófitos (11 especies) y de patogenicidad intermedia (11 especies) (Levett y Smythe, 2008; Guglielmini *et al.*, 2019). Además, mediante la clasificación serológica se han definido a los serovares como la unidad taxonómica, ya que tienen una estructura antigénica característica (Zárate *et al.*, 2012), habiéndose identifi-

cado en la actualidad más de 300 serovares patógenos, divididos en 24 serogrupos (Cerqueira y Picardeau, 2009). Los serovares con antígenos en común pertenecen al mismo serogrupo (Quinn *et al.*, 2011; Guglielmini *et al.*, 2019). Los serovares con antígenos en común pertenecen al mismo serogrupo (Quinn *et al.*, 2011). El serovar mejor adaptado en bovinos es *Hardjo*. Así mismo, se ha demostrado que *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* y serovar *Icterohaemorrhagiae* son causales frecuentes de infección en bovinos (Molina *et al.*, 2011).

Los hospederos incidentales, en donde están incluidos mamíferos domésticos, de producción y el hombre (Moreno, 2012), desarrollan la forma severa de la enfermedad, pero no actúan como transmisores eficientes de *Leptospira* spp a otros animales (Quinn *et al.*, 2011). En el bovino, la transmisión de esta bacteria se produce a través de membranas mucosas, conjuntiva o por lesiones en la piel (Baquero *et al.*, 2010). Los rumiantes tienen gran importancia en la diseminación de la enfermedad, ya que la orina alcalina permite mayor viabilidad de estas bacterias en comparación con una orina ácida (Moreno, 2012).

La leptospirosis bovina tiene un alto impacto económico en la actividad pecuaria, debido a la ocurrencia de abortos (Cantón *et al.*, 2014), reabsorciones fetales, infertilidad, nacimiento de animales débiles y disminución de la producción láctea (Ellis, 2015; Dereje *et al.*, 2018). Además, su diagnóstico es imprescindible para diferenciar esta patología de otras enfermedades reproductivas que afectan al hato (Rodríguez y Ramírez, 2011), tales como brucelosis, campylobacteriosis, neosporosis, diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina (Zárate *et al.*, 2015).

El diagnóstico de leptospirosis se basa principalmente en la identificación del agente mediante métodos microbiológicos, moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y serológicos como la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) (OIE, 2014). El diagnóstico por PCR es ampliamente utilizado (Picardeau *et al.*, 2014) pues permite un diagnóstico precoz, con resultados reproducibles y de fácil interpretación (Moreno y Agudelo, 2010). La extracción de ADN de las leptospirosis se puede hacer a partir de muestras clínicas de diferente tipo (Martín *et al.*, 2015); consecuentemente, se debe considerar la elección del protocolo apropiado que permita la obtención de material genético de calidad; asimismo, la selección de iniciadores dependerá la sensibilidad y especificidad de la técnica (OMS, 2008; Alegre *et al.*, 2013). En este estudio se evaluaron tres protocolos de extracción de ADN genómico con el objetivo de determinar el método adecuado para detectar la presencia de *Leptospira* spp mediante PCR en muestras de orina bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó, primeramente, la estandarización de los métodos de extracción de ADN en muestras de orina bovina e inoculadas experimentalmente con los serovares de *Leptospira Hardjo*, *Ictero-*

haemorrhagiae y *Wolffi*. Posteriormente se trabajó con muestras de orina recolectadas en campo para comprobar la efectividad de los protocolos. Las muestras de orina fueron conservadas a 4 °C y diluidas en PBS 1X a fin de neutralizar la orina, centrifugaron para obtener el sedimento con las bacterias, procesándose en un tiempo máximo de 72 horas, según lo indican varias investigaciones (Lucchesi *et al.*, 2004; Harkin *et al.*, 2005; Rossetti y Boggia, 2014).

Protocolos de Extracción de ADN Genómico

El trabajo de laboratorio se realizó en los laboratorios de Diagnóstico Animal y Biología Molecular de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD), ubicados en la provincia de Pichincha, ciudad de Quito, Ecuador.

Cultivo de *Leptospira* spp

Se trabajó con cultivos de *Leptospira* spp del laboratorio arriba indicado, los cuales fueron mantenidos en el medio EMJH (Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris) a 29 °C, y repicados cada semana a fin de disponer de cultivos aptos para ser inoculados en las muestras de orina.

Inoculación en muestras de orina

Se trabajó con cuatro muestras de orina bovina (9 ml). Dos fueron colectadas en el Centro Experimental Uyumbicho de la Universidad Central del Ecuador, (parroquia de Uyumbicho, provincia de Pichincha) y las otras se colectaron en la ciudad de Tulcán, provincia del Carchi. Las muestras fueron diluidas a partes iguales en PBS, pH 7.4 y depositadas en tubos Falcon®. Primeramente se realizó la extracción de una muestra de orina sin inóculo bacteriano para verificar su negatividad a *Leptospira* spp mediante PCR. Luego, las muestras fueron inoculadas con 1 ml de cultivo de los tres serovares (10⁸ bacterias/ml), debido a que los portadores renales crónicos pueden llegar a excretar esa

concentración de espiroquetas (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). La muestra inoculada se mantuvo en refrigeración hasta el momento de la extracción. Además, se preparó un control negativo, únicamente con orina diluida en PBS 1X.

Extracción de ADN Genómico

Se estandarizaron tres métodos de extracción de ADN genómico de *Leptospira* spp a partir de orina bovina: Etanol-Hidróxido de Sodio (EtNa) (según Vingataramin y Frost, 2015), resina quelante Chelex® 100 (Bio-Rad, USA) (según el protocolo de Noda y Rodríguez, 2014) y el estuche de extracción comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA).

- *Etanol-Hidróxido de Sodio (EtNa)*: Se siguió el protocolo de Vingataramin y Frost (2015). Se centrifugaron los tubos Falcon® a 4100 x g por 20 min, se removió el sobrenadante, excepto 1 ml, y se resuspendió el pellet en el volumen restante. Se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13 000 x g por 5 min. Se removió cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X pH=7.4 estéril. Luego se centrifugó a 13 000 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 100 µl de PBS 1X, se añadió 455 µl de la solución de extracción de ADN EtNa, se mezcló brevemente y se llevó a 80 °C por 10 min en termobloque. Se centrifugó a 16.060 x g por 10 min, se removió el sobrenadante y finalmente se resuspendió el pellet en 100 µl de la solución de resuspensión de ADN.
- *Extracción de ADN Genómico utilizando Chelex®*: Se preparó una solución de Chelex® (Bio-Rad, USA) al 5% en buffer TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0), y se siguió el protocolo basado en la publicación de Noda y Rodríguez (2014).

- *Extracción de ADN Genómico utilizando el Estuche de Extracción Comercial Pure-Link® Genomic DNA Mini Kit*: Se siguieron las especificaciones del fabricante.

Protocolos de PCR

Se utilizaron 5 µl del ADN genómico extraído como molde para los tres protocolos de PCR, tanto para las muestras inoculadas experimentalmente como para las muestras colectadas en campo. Se emplearon tres pares de cebadores reportados por León *et al.* (2006), permitiendo identificar: a) género *Leptospira* (*rrl* Forward 5'GACCCGAGCCTGTCGAG3'/*rrl* Reverse 5'GCCATGCTTAGTCCCGATTAC3') con un producto de 482 pb, b) patogenicidad, amplificando un producto de 262 pb (*hap1* Forward 5'GCAAGCATTACCGCTTGTGG3'/*hap1* Reverse 5'TGTTGG-GGAAATCATACGAAC3') y c) especie saprófita, con un amplicón de 240 pb (*rrs* Forward 5'AGAAATTTGTGCTAATACCGAATGT3'/*rrs* Reverse 5'GGCGTCGCTGCTTCAGGCTTTTCG3'). Se incluyó un control negativo (agua DEPC) y un control positivo (muestra de orina negativa confirmada por PCR e inoculada con *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*).

La mezcla maestra se preparó con las siguientes condiciones: 0.2 µM de cada cebador, 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 0.2 mM dNTPs (Promega) y 1 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. El perfil térmico para cada par de cebadores se realizó según estudios preliminares (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011), de acuerdo al siguiente detalle:

- *rrl*: Incubación a 95 °C durante 5 min, seguido de 39 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, 57 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min y una extensión final durante 5 min a 72 °C.
- *hap1*: Incubación a 94 °C durante 5 min, seguido de 44 ciclos de amplificación a 94 °C durante 15 s, 56 °C durante 35 s y

72 °C durante 40 s y una extensión final durante 5 min a 72 °C.

- *rrs*: Incubación a 98 °C durante 2 min, seguido de 44 ciclos de amplificación a 98 °C durante 15 s, 63 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y una extensión final durante 10 min a 72 °C.

La electroforesis del producto amplificado en la PCR se realizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe™ (1 µl por cada 10 ml de buffer) por aproximadamente 40 minutos a 100 V.

Límite de detección

Se determinó el límite de detección analítica en tres ensayos consecutivos. Se inocularon muestras de orina con diluciones seriadas en base 10 de un cultivo de *Leptospira* spp de cinco días de edad, partiendo de una concentración de 10⁸ hasta obtener una dilución de 10¹ células/ml de orina. Para este fin se empleó el cultivo de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, el cual fue seleccionado debido a su adaptación en bovinos y el protocolo para los iniciadores *hap 1*.

Presencia de *Leptospira* spp en Orina Bovina

Actividades de campo

El trabajo de campo se llevó a cabo en dos fincas con ganado *Bos indicus* con predominio de Gyr, con animales entre cuatro meses y siete años, machos y hembras. Los animales se encontraban en un sistema de crianza de tipo tradicional (extensivo), alimentados con pasto Saboya (*Panicum maximum*) y manipulados únicamente para la administración de antiparasitarios y vacunas contra carbunco sintomático, edema maligno y pasteurelisis. Las fincas están localizadas en los cantones de Chone y Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Se seleccionaron al azar 100 bovinos clínicamente sanos para la recolección, pero solo se emplearon 72 muestras debido a la cantidad insuficiente de orina. Para la colección de la orina se hizo previamente un lavado de la zona vulvar y perianal con agua jabonosa y se administró furosemida por vía intramuscular a una dosis de 1 mg/kg. Las muestras se colectaron por micción espontánea en envases estériles de 100 ml de capacidad. Se tomaron 7 ml orina para cada método de extracción en tubos Falcón. Se agregó 7 ml de PBS 1X, pH 7.4, para obtener una dilución 1:1 en cada tubo. Las muestras neutralizadas fueron refrigeradas y transportadas de inmediato a los laboratorios de AGROCALIDAD, al igual que los remanentes de orina para su respectivo desecho como material infeccioso.

Análisis de Datos

La evaluación de los métodos de extracción se realizó mediante la determinación del índice Kappa y se calculó el porcentaje de presencia de leptospirosis en los animales muestreados.

RESULTADOS

Protocolos de Extracción

La extracción del ADN genómico de las estas muestras se realizó mediante los tres métodos de extracción en estudio. El ADN genómico de *Leptospira* spp extraído fue analizado mediante PCR utilizando los iniciadores *hap 1*, los cuales amplificaron un fragmento esperado de 262 pb. Estos iniciadores amplifican para genes que codifican proteínas asociadas a la hemólisis y, consecuentemente, a patogenicidad. Se evidenció el fragmento esperado de 262 pb, excepto para el serovar Wolffi, donde no se observó amplificación. Por lo tanto, en el caso de Wolffi el PCR se realizó utilizando los iniciadores género específicos *rrl*, llegando a mostrarse el fragmento esperado de 482 pb.

Cuadro 1. Sensibilidad analítica de los tres métodos de extracción de ADN de muestras de orina inoculada con *Leptospira* spp. Resumen de tres repeticiones

Método de extracción	Dilución							
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
EtNa	+	+	+/-	-	-	-	-	-
Purelink® Genomic DNA Mini Kit	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
Chelex-100	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-

(+): PCR positivo; (-); PCR negativo; (+/-) PCR variable

Los resultados para la determinación del límite de detección de ADN genómico se muestran en el Cuadro 1 y Figuras 1 y 2.

Presencia de *Leptospira* spp en Orina Bovina

Se analizaron 72 muestras de orina de bovinos mediante los dos métodos de extracción de ADN con mejor sensibilidad analítica en las pruebas experimentales (Purelink® Genomic DNA Mini Kut y Chelex-100). De estas muestras, 10 amplificaron para el gen *rrl*, específico de especie, 8 muestras amplificaron para el gen de patogenicidad *hap 1*, y ninguna amplificó para el gen *rrs* (Cuadro 3).

A fin de evaluar el índice de concordancia de los dos métodos de extracción con mejor límite de detección (PureLink® Genomic DNA Mini Kit y Chelex-100) se utilizaron las 72 muestras de orina y luego se realizó la PCR con el par de cebadores de patogenicidad *hap 1*. Con el método de extracción Chelex-100 se obtuvieron 8 muestras positivas, mientras que con el método PureLink® Genomic DNA Mini Kit solo se detectaron 5 de los 8 positivos al gen *hap 1* (Cuadro 4). El valor obtenido del índice Kappa (K=0.74) fue bueno, demostrando la concordancia que exis-

te más allá del azar entre los métodos de extracción de ADN genómico Purelink® Genomic DNA Mini Kt y Chelex-100.

DISCUSIÓN

El diagnóstico definitivo de leptospirosis requiere de la identificación del agente etiológico a través de pruebas de laboratorio (Agudelo *et al.*, 2006). La PCR es una técnica diagnóstica que permite la identificación rápida y oportuna de animales infectados a través de muestras de sangre u orina (Levett, 2001), permitiendo identificar a aquellos animales en fase de leptospirosis (García *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos por PCR deben ser interpretados apropiadamente. Ante un resultado negativo se requiere considerar factores tales como una conservación inadecuada de la muestra, la excreción intermitente de *Leptospira* spp a través de la orina, la elección de un método de extracción inadecuado y la presencia de inhibidores de la PCR (Martín *et al.*, 2015). En ese sentido, esta investigación se enfocó en optimizar un protocolo de extracción de ADN genómico de

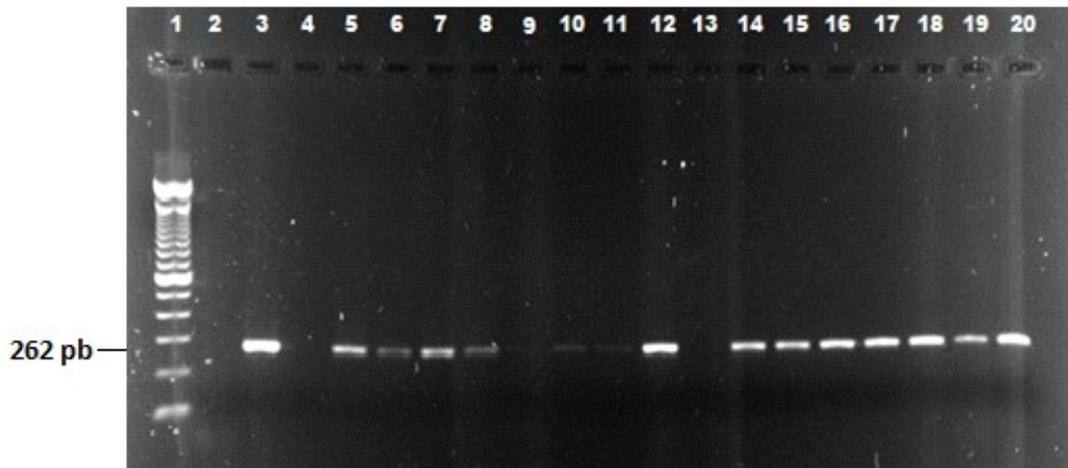


Figura 1. Electroforesis del ensayo de sensibilidad analítica utilizando dos métodos de extracción de ADN en muestras de orina inoculadas con concentraciones de *Leptospira* spp de 10^1 a 10^8 /ml: Purelink® Genomic DNA Mini Kit (K) vs Chelex-100 (Ch). Carriles 1. 100 pb Ladder; 2. H₂O (control negativo); 3. *L. Hardjo* (K) (Control positivo, 10^8); 4. Orina (K), 5 a 11. Orina + *L. Hardjo* (10^7 hasta 10^1) (K); 12. *L. Hardjo* (Ch) (Control positivo, 10^8); 13. Orina (Ch); 14 a 20 Orina + *L. Hardjo* (10^7 hasta 10^1) (Ch)

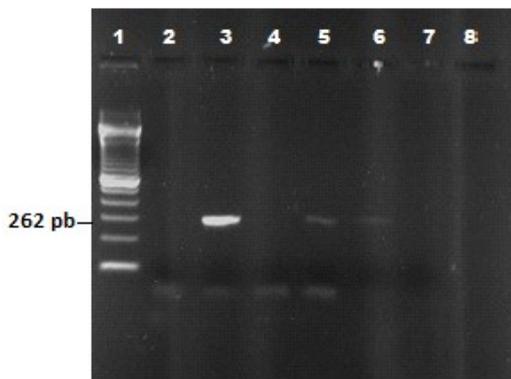


Figura 2. Electroforesis del ensayo de sensibilidad analítica utilizando el método EtNa para la extracción de ADN en muestras de orina inoculadas con concentraciones de *Leptospira* spp de 10^4 a 10^8 /ml: Carriles 1. 100 pb Ladder; 2. H₂O (control negativo); 3. *L. Hardjo* EtNa (Control positivo, 10^8); 4. Orina, 5 a 8. Orina + *L. Hardjo* (10^7 hasta 10^4)

Leptospira spp a fin de obtener mejores resultados en la técnica de PCR.

El método EtNa demostró ser útil para la extracción de ADN a partir de muestras de orina inoculadas con una alta concentración bacteriana, lo cual se evidenció luego de la amplificación de un fragmento esperado de 262 pb que codifica para el gen LipL32. Estos datos concuerdan con el trabajo de Vingataramin y Frost (2015) con este método a partir de cultivos puros, suspensión en solución salina de colonias, orina y líquido cefalorraquídeo de microorganismos gram positivos, gram negativos y levaduras.

En las extracciones de ADN con los otros dos métodos, Chelex-100® y Purelink® Genomic DNA Mini Kit, se evidenció también un fragmento esperado de 262 pb que codifican para el gen LipL32 de

Cuadro 2. Cuantificación de ADN obtenido por los tres métodos de extracción en muestras de orina inoculada con *Leptospira* spp

Purelink® Genomic DNA Mini Kit							
Dilución	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Promedio de rendimiento (ng/μl)	0.80	2.10	0.00	3.30	1.00	4.00	2.40
Calidad promedio (260/280)	1.62	1.24	0.33	1.38	1.49	1.36	1.12
Chelex-100							
Dilución	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Promedio de rendimiento (ng/μl)	10.80	13.90	14.20	7.50	8.70	7.80	9.60
Calidad promedio (260/280)	1.32	1.39	1.35	1.29	1.19	1.13	1.26
EtNa							
Dilución	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Promedio de rendimiento (ng/μl)	-19.80	-	-	-	-	-	-
Calidad promedio (260/280)	0.40	0.42	0.43	0.46	0.42	0.35	0.37

Se consideraron satisfactorios los resultados de cuantificación obtenidos por los métodos Purelink® Genomic DNA Mini Kit y Chelex-100. Con esta base se decidió descartar a EtNa como método de extracción para las muestras de campo

Leptospira spp; sin embargo, el serovar Wolfii no pudo ser amplificado en orina al usar estos métodos de extracción empleando los iniciadores para la identificación de patogenicidad, no así a partir de cultivo puro donde los tres métodos de extracción amplificaron el producto esperado para el gen *rrl*. Esto podría deberse a que la proteína LipL32 asociada a la hemólisis no tiene genes ortólogos en las especies saprófitas, y únicamente ha sido identificada en especies patógenas de *Leptospira* (Haake *et al.*, 2000), ocurriendo

probablemente lo mismo en las especies de patogenicidad incierta, como es el caso de *L. Wolfii* (Ko *et al.*, 2009).

El método de extracción por EtNa, en la cual se amplificó el fragmento esperado de 262 pb, evidenció una baja sensibilidad, observándose tan solo en las diluciones de mayor concentración (10⁸ a 10⁶ bacterias/ml). Estos datos concuerdan parcialmente con los resultados de Vingataramin y Frost (2015) quienes observaron que EtNa fue un método

Cuadro 3. Muestras de orina bovina positivas a leptospirosis, empleando los tres protocolos de PCR, de acuerdo con los tres pares de cebadores

Muestra	<i>rrl</i>	<i>hap 1</i>	<i>rrs</i>
1	-	-	-
2	+	+	-
3 - 6	-	-	-
7	+	+	-
8 - 32	-	-	-
33	+	-	-
4 - 35	-	-	-
36	+	+	-
37	+	-	-
38 - 52	-	-	-
53	+	+	-
54 - 61	-	-	-
62	+	+	-
63	-	-	-
64	+	+	-
65 - 70	-	-	-
71	+	+	-
72	+	+	-
Total (+)	10	8	0

(+): PCR positivo; (-); PCR negativo

eficiente al trabajar con concentraciones elevadas (10^9) y bajas (10^3) de microorganismos grampositivos, gramnegativos y levaduras. La baja sensibilidad de este método podría deberse a que la presencia de inhibidores en la orina como cristales, hemoglobina y de hormonas (Gaydos *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2005) que pudieron haber interferido con la PCR. Este inconveniente podría resolverse con una etapa de purificación de ADN en columnas de sílice (Vingataramin y Frost, 2015), aunque incrementaría el tiempo y el costo de la prueba.

El método Chelex-100 en buffer TE demostró ser el método más eficiente. Los resultados del índice de concordancia Kappa entre este método y PureLink® Genomic DNA Mini Kit, fue bueno ($K=0.74$), demostrando la concordancia que existe entre estos dos métodos más allá del azar. Mediante esta técnica de extracción de ADN se obtuvo el mayor número de resultados positivos a partir de muestras clínicas ($n=8$). Céspedes *et al.* (2008) concluyeron que este era el método más adecuado para la extracción en orina humana, logrando detectar *Leptospira* hasta una concentración de 10^3 bacterias/ml. Así mismo, Villumsen *et al.* (2012) y Noda & Rodríguez (2014) obtuvieron excelentes resultados con Chelex-100 al trabajar sobre sangre y orina humana. Además, la eficiencia de este protocolo en comparación con el kit comercial podría deberse a que en los procesos de purificación en columnas de sílice se perdería cierta cantidad de ADN (Noda y Rodríguez, 2014).

El gen *hap 1* se amplificó en 8 de 72 muestras clínicas, detectando así, la presencia de leptospirosis patógenas (Evangelista y Coburn, 2010). Debido a esto, fue necesario utilizar también cebadores para identificar especies de patogenicidad incierta y saprofitas, las cuales también podrían estar presentes en muestras de orina, y descartar la existencia de falsos negativos a causa de los métodos de extracción empleados.

CONCLUSIONES

- El protocolo Chelex-100 fue el que presentó mejores resultados para la extracción de ADN genómico de *Leptospira* spp a partir de muestras de orina bovina inoculada experimentalmente, en cuanto a calidad de ADN extraído y sensibilidad analítica. Por lo tanto, fue considerado el método de elección para diagnóstico de campo de leptospirosis bovina mediante PCR

Cuadro 4. Animales excretores de *Leptospira* spp. patógena identificados por los métodos de extracción PureLink® Genomic DNA Mini Kit y Chelex-100

		Chelex - 100		Total
		Positivos	Negativos	
PureLink® Genomic DNA Mini Kit	Positivos	5	0	5
	Negativos	3	64	67
	Total	8	64	72

- El método de extracción EtNa mostró resultados insatisfactorios para ser empleado como método eficaz para la extracción de ADN genómico *Leptospira* spp.
- La prueba Kappa determinó una buena concordancia ($K^M=0.74$) entre los métodos de extracción Chelex-100 y el kit comercial Purelink® Genomic DNA Mini Kit.

Agradecimiento

Al Dr. Euclides de la Torre Andrade, MSc Patricia Medranda, Ing. Guido de la Torre, M.V.Z. Juan Delgado, al Sr. Santiago Romero, M.V. María Elena Rovalino y M.V.Z. Juan Pablo Durán por su apoyo y confianza durante el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Nelson Cabrera, Dra. Maritza Barrera, M.V.Z. Mercy Falconí e Ing. Ana Garrido por permitir realizar esta investigación en los laboratorios de Diagnóstico Animal y Biología Molecular - AGROCALIDAD.

LITERATURA CITADA

1. **Adler B, de la Peña Moctezuma A. 2010.** *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-296. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012
2. **Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Lotero MA, Lotero MA. 2006.** Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Biomédica* 26: 216-223. doi: 10.7705/biomedica.v26i2.1411
3. **Alegre EA, Biasio MB, Ramírez NN, Ruiz RM, Batiani CE. 2013.** Detección y diferenciación molecular de *Leptospira* sp utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN. *Rev Vet* 24: 53-55.
4. **Baquero M, Gómez AP, Hernández P. 2010.** Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp. *Rev Med Vet* 19: 101-111.
5. **Cameron CE. 2015.** Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol* 387: 21-41. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_3
6. **Cantón G, Bence A, Hecker Y, Fiorentino MA, Moore DP, García JA, et al. 2014.** Alta incidencia de *Leptospira interrogans* en la casuística de abortos bovinos registrados durante 2013-2014 en INTA EEA Balcarce. En: Reunión Científico Técnica de la AAVLD. San Miguel de Tucumán, Argentina.
7. **Cerqueira GM, Picardeau M. 2009.** A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9: 760-768. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009
8. **Céspedes M, Balda L, Glenny M. 2008.** Evaluación de dos ensayos de ELISA IgM en la investigación de un brote de leptospirosis. *Rev Per Med Exp Salud Públ* 25: 333-335.

9. **Céspedes ZM. 2005.** Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Rev Per Med Exp Salud Públ* 22: 290-307.
10. **Dereje T, Benti D, Feyisa B, Abiy G 2018.** Review of common causes of abortion in dairy cattle in Ethiopia. *J Vet Med Anim Health* 10: 1-13. doi: 10.5897/jvmah2017.0639
11. **Ellis WA. 2015.** Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 99-137. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_6
12. **Evangelista KV, Coburn J. 2010.** *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 5: 1413-1425. doi: 10.2217/fmb.10.102
13. **Fonseca D, Gutiérrez A, Mateus H, Silva C, Contreras N, Giraldo A. 2005.** Análisis de muestras de orina para la detección molecular de enfermedades infecciosas. Aplicación en la identificación de citomegalovirus humano. *Ciencias de la Salud* 3: 136-147.
14. **García R, Reyes A, Basilio D, Ramírez M, Rivas B. 2013.** Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Clin* 60: 57-70.
15. **Gaydos CA, Theodore M, Dalesio N, Wood BJ, Quinn TC. 2004.** Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 42: 3041-3045. doi: 10.1128/JCM.42.7.3041-3045.2004
16. **Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. 2019.** Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis* 13(4): e0007374. doi: 10.1371/journal.pntd.0007374
17. **Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, et al. 2000.** The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276-2285. doi: 10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000
18. **Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. 2005.** Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1230-1233. doi: 10.2460/javma.2003.222.1230
19. **Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. 2011.** A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Meth* 84: 1-7. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.021
20. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009.** *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736-747. doi: 10.1038/nrmicro2208
21. **Léon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, André-Fontaine G, Laugier C, et al. 2006.** Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J Vet Diagn Invest* 18: 218-221. doi: 10.1177/104063870601800216
22. **Levett PN, Smythe L. 2008.** International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *Int J Syst Evol Micr* 58: 1049-1050. doi: 10.1099/ijs.0.2008/000190-0
23. **Levett PN. 2001.** Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
24. **Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. 2004.** Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 131-134. doi: 10.1590/S0037-86822004000200003
25. **Martín PL, Arauz MS, Stanchi NO. 2015.** Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Vet* 35: 26-38.

26. **Molina M, Pérez H, Mosquera O, Rodríguez K, Rivas R. 2011.** Epidemiología de la leptospirosis en la ganadería bovina de Los Llanos Centrales de Venezuela diagnosticados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas período 2005-2010. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara* 1: 26-28.
27. **Moreno E. 2012.** Seroprevalencia de nueve serovares de *Leptospira interrogans* en carnívoros, ungulados y primates silvestres en cautiverio. Tesis de Médico Veterinario. Santiago de Chile: Univ. de Chile. 21 p.
28. **Moreno N, Agudelo-Flórez P. 2010.** Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Per Med Exp Salud Pública* 27: 548-556.
29. **Noda A, Rodríguez I. 2014.** DNA isolation by Chelex-100: an efficient approach to consider in leptospirosis early stages. *J Coastal Life Med* 2: 501-504. doi: 10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0018
30. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2014.** Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. París: OIE. [Internet]. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
31. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2008.** Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. [Internet]. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
32. **Pacheco G. 2015.** Una visión general de la leptospirosis. *J Agric Anim Sci* 1: 46-63.
33. **Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. 2014.** Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microb Infect Dis* 78: 1-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012
34. **Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan P. 2011.** *Veterinary microbiology and microbial disease.* Wiley-Blackwell. 928 p.
35. **Raddi G, Morado DR, Yan J, Haake DA, Yang XF, Liu J. 2012.** Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *J Bacteriol* 194: 1299-1306. doi: 10.1128/JB.06474-11
36. **Rodríguez PH, Ramírez AP. 2011.** Leptospirosis: una zoonosis que afecta a la salud pública y la producción pecuaria. *Rev Cienc Anim* 4: 15-23.
37. **Rossetti CA, Boggia V. 2014.** Evaluation of polymerase chain reaction assay for pathogenic *Leptospira* detection in stored urine. *Microbiol Res* 5(1). doi: 10.4081/mr.2014.5427
38. **Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Picardeau M, Goarant C. 2018.** Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom* 4(1). doi: 10.1099/mgen.0.000144
39. **Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. 2012.** Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Meth* 91: 184-190. doi: 10.1016/j.mimet.2012.06.009
40. **Vingataramin L, Frost EH. 2015.** A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques* 58: 120-125. doi: 10.2144/000114263
41. **Zárate J, Rosete J, Ríos A, Barradas F, Olazarán S. 2015.** Prevalencia de Leptospirosis y su relación con la tasa de gestación en bovinos de la zona centro de Veracruz. *Nova Scientia* 7: 202-217.