



---

---

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**Facultad de Medicina**  
**Licenciatura en Biomedicina**  
**Eje Terminal de Microbiología**  
**Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular**

**“Detección de *Leptospira* sp. en diferentes  
ambientes acuáticos”**

**Tesis que para obtener el título de Licenciada en Biomedicina**

**Presenta:**

**Angelica Ramírez Aguila**

**Director de tesis:**

**D.C. Marcos Flores Encarnación**

**Puebla, Pue. Octubre 2016**

## ÍNDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes.....	6
Sobrevivencia de <i>Leptospira</i> patógena.....	7
Patogenia.....	8
Factores de virulencia.....	10
Manifestaciones clínicas .....	12
Diagnóstico.....	13
<i>LipL32</i> .....	14
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos .....	19
Material y métodos .....	20
Material biológico.....	20
Sitios de monitoreo.....	20
Recuperación de microorganismos .....	21
Extracción de DNA genómico .....	21
PCR.....	22
Electroforesis.....	22
Esquema de trabajo.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	35
Conclusión .....	39
Perspectivas.....	40
Bibliografía.....	41

**“Detección de *Leptospira* sp. en diferentes  
ambientes acuáticos”**

## RESUMEN

Se realizó un estudio del agua procedente de lagunas y lagos de la Ciudad de Puebla, como son el Parque Ecológico Revolución Mexicana, la laguna de San Baltazar, el Jardín Botánico de la BUAP, la laguna de Chapulco y de la presa de Valsequillo (San Baltazar Tetela), que son considerados centros recreativos y al mismo tiempo pueden constituir un foco de transmisión de algunas enfermedades. En los últimos años se han realizado diversos estudios sobre el agua, destacando la presencia de agentes bacterianos que sobreviven y se adaptan al medio acuático. Lo anterior representa un factor de riesgo para las personas que tienen contacto con este tipo de agua y puede constituir un problema de Salud pública a nivel mundial.

Mención especial merecen las leptopiras patógenas que se transmiten a través del agua contaminada con orina de ratas y ratones (portadores naturales de la bacteria). Los síntomas de la leptospirosis son muy similares a los de otras enfermedades, ya que se presenta con mialgias, artralgias, cefalea, malestar general, etc, por lo que puede confundirse con dengue, gripe y otras enfermedades. El padecimientos se presenta en dos fases: aguda y crónica; la primera puede ser tratable siempre y cuando la enfermedad no haya causado daños severos en órganos internos y sea detectada a tiempo. En la fase crónica, hay una falla generalizada de órganos y sistemas lo que conduce a la muerte. La liberación de la lipoproteína (LipL32) induce una inflamación de órganos y esto conlleva a necrosis o muerte celular.

Debido a que no hay reportes en México que alerten de la presencia de leptopiras patógenas en el agua y no están disponibles las técnicas adecuadas y necesarias para el diagnóstico de la leptospirosis, se realizó un estudio para detectar a la bacteria en muestras de agua a través de la amplificación por PCR del gen *lipL32*, presente en especies patógenas.

## INTRODUCCIÓN

El agua es indispensable para la vida, no tiene sustituto y no se conoce forma de vida que prescindiera de ella. Es ampliamente utilizada en actividades diarias, como la agricultura, la industria, el uso doméstico, entre otras. De ahí la importancia de conservar y mantener la calidad de las fuentes naturales de agua (**Arcos et al., 2005**). El abastecimiento de agua en cantidad y calidad, es primordial para la salud humana y de acuerdo al régimen de abastecimiento se puede dividir en: sistemas individuales, que incluyen aguas subterráneas como pozos y manantiales; aguas superficiales, como ríos, arroyos, lagos, lagunas, etc. y en sistemas de distribución de red que pueden ser superficiales y profundas (**Zamora et al., 2002**).

El agua hace posible un medio ambiente saludable pero puede ser el principal vehículo de transmisión de enfermedades, ya que el agua se ha contaminado con desechos humanos, animales o químicos (**González et al., 2011**). Existen factores que permiten el desarrollo de microorganismos en el agua como: la cantidad y tipo de nutrientes, la concentración de oxígeno, la temperatura, el pH, la concentración de desinfectantes y material de fabricación de tuberías (**Arcos et al., 2005**). Las enfermedades causadas por la mala calidad del agua de consumo humano son frecuentes en todo el mundo. Ocurren por diferentes causas, como la falta de un tratamiento correcto o por contaminación en las redes de distribución provocando diversas enfermedades, algunas de ellas de alto impacto en la morbilidad y mortalidad (**Vidal et al 2009**). La contaminación fecal de las aguas superficiales es uno de los problemas más preocupantes en los países en vías de desarrollo. Esta contaminación se debe al vertimiento de los desagües sin ningún tratamiento (**Arcos et al., 2005**).

Entre las enfermedades infecciosas transmitidas a través del agua se pueden citar a la fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi*; el cólera causado por *Vibrio cholerae*, la disentería provocada por *Entamoeba histolítica* y *Shigella sp.*, la gastroenteritis causada por virus, bacterias y protozoarios, la hepatitis infecciosa causada por el virus de la hepatitis, la poliomiелitis causada por el virus de la poliomiелitis y

leptospirosis causado por especies patógenas de leptospiras, entre ellas *Leptospira interrogans* y otras **(Martínez et al., 2009)**.

## ANTECEDENTES

La leptospirosis es una enfermedad generalizada, de curso agudo y de distribución mundial, producida por diversas serovariedades de la *Leptospira* sp. Muchas especies de mamíferos son susceptibles a esta bacteria como el hombre; los reservorios más comunes son el perro y algunos roedores. En México los primeros casos de leptospirosis fueron reportados en Yucatán por Noguchi y Klieger en 1920. A partir de esa fecha fueron apareciendo reportes aislados, en su mayoría de corte eminentemente sero-epidemiológicos. En 1997 se realizaron estudios epidemiológicos en Yucatán, Valle de México y la ciudad de México y se reportó una positividad del 14.4% en 9,875 sueros estudiados entre 1961 y 1995 **(Vado et al., 2002)**. Así mismo en 1998, se encontró nuevamente un 14% de seropositividad con casos de leptospirosis, diagnosticados clínicamente de forma errónea con dengue, durante un brote epidémico **(Zavala et al., 1998)**.

En México, en el periodo 2003 - 2008, la tasa nacional de leptospirosis fue de 0.6 a 2.1 casos por 10,000 habitantes, con el pico máximo en el año 2007, en el cual los cambios meteorológicos propiciaron el incremento del número de casos. Las entidades federativas con las tasas más elevadas fueron Tabasco, Oaxaca e Hidalgo. Cabe señalar que estos estados tienen el antecedente de haber sufrido severas inundaciones **(Caro et al., 2010)**.

Las leptospiras son bacterias Gram-negativas en forma de espiroqueta que miden alrededor de 0.1 µm de diámetro por 6 a 20 µm de longitud e incluyen especies saprófitas y patógenas. Las especies saprófitas del género *Leptospira* sp. incluyen a: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthiellii*, y *L. wolbachii*. Mientras que las especies patógenas del género *Leptospira* sp. incluyen a: *L. interrogans*, *L.*

*alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii* (**Palaniappan et al., 2007**).

## **SOBREVIVENCIA DE LAS LEPTOSPIRAS PATÓGENAS EN EL AGUA**

La leptospirosis es causada por la infección de leptospiiras patógenas. La leptospirosis es una zoonosis particularmente prevalente en los países en vías de desarrollo (**Velasco et al., 2009**). La enfermedad en humanos puede variar desde una infección subclínica hasta un síndrome severo de rápida progresión y elevada mortalidad, o aparecer como grandes brotes en zonas urbanas de países en desarrollo. La enfermedad es más frecuente en regiones de clima subtropical y tropical húmedo (**González et al., 2006**).

Las leptospiiras tienen una capacidad especial de adaptación al agua (**Kupek et al., 2000**). Las especies patógenas parecen tener una capacidad de resistencia a la carencia de nutrientes, superior a otros patógenos bacterianos e incluso géneros adaptados al agua como el *Vibrio* sp. (**Islam et al., 1994**). Otros géneros bacterianos patógenos responden a la carencia de nutrientes produciendo formas viables no cultivables; sin embargo las leptopiras patógenas parecen mantenerse activas con motilidad y son cultivables por períodos de tiempo posiblemente superiores a 98 días (**Trueba et al., 2002**). Pueden sobrevivir por muchos meses en ambientes húmedos, principalmente en climas con temperaturas mayores a 22°C y a pH neutro. Su crecimiento es inhibido por aguas saladas o pH ácido (**Solano et al., 1996**). La lluvia incrementa la posibilidad de supervivencia y posiblemente la multiplicación y diseminación de las leptospiiras patógenas en el medio ambiente. La acumulación de agua es un factor importante para la acumulación de las bacterias (**Trueba et al., 2002**). Algunos eventos naturales como los terremotos, los periodos de lluvias intensas u otros desastres, incrementan el riesgo de brotes de la enfermedad, debido al aumento de la población de roedores y/o del terreno propicio para la sobrevivencia de la bacteria. Se

ha demostrado la exposición ocupacional a la bacteria en agricultores, rancheros, trabajadores de los mataderos, cazadores, veterinarios, leñadores, personas que trabajan en las alcantarillas y en los arrozales, así como en el personal militar **(Caro et al., 2010)**. Así mismo, existe el riesgo para los bañistas, deportistas y excursionistas que acampan o se bañan en lugares visiblemente no aptos. La exposición en el hogar es a través de mascotas como perros, ganado doméstico, sistemas de recolección de aguas de lluvia e infestación por roedores infectados **(Caro et al., 2010)**.

Por lo tanto, los factores culturales, ecológicos y socioeconómicos, que hacen que la población esté más expuesta a la transmisión que los habitantes del área urbana, son: la extrema e inadecuada convivencia con animales domésticos y peridomésticos (perros, bovinos, cerdos y roedores). En el campo, el contacto con lugares donde los reservorios han depositado la orina contaminada con leptospiras patógenas; la pobre higiene con que almacenan el agua y sus alimentos, al quedar expuestos a la contaminación por reservorios. La leptospirosis se transmite en todas las épocas del año, sin embargo, en regiones tropicales o subtropicales la incidencia aumenta habitualmente en los meses de mayor precipitación pluvial y mayor actividad agrícola y recreacional **(Vado et al., 2002)**.

## **PATOGENIA**

Los reservorios animales más importantes son las ratas, las cuales pueden permanecer como portadoras durante toda su vida **(Solano et al., 1996)**. Los animales infectados eliminan leptospiras por la orina, contaminando el agua, la tierra y los alimentos, transmitiéndole la enfermedad a otro animal o al hombre. La bacteria penetra a través de la piel erosionada, así como también por la piel y las mucosas sanas, que han permanecido inmersas en el agua por tiempo prolongado, llegando así a la circulación, diseminándose por vía hemática y linfática **(Maris et al., 2011)**. Con menor frecuencia, la leptospirosis es adquirida por contacto directo con sangre o tejidos de animales infectados; infrecuentemente la infección se atribuye a

accidentes de laboratorio o bien mediante la ingestión de la leche materna **(Solano et al., 1996)**. Transcurridas las primeras 48 horas, las bacterias pueden alcanzar todos los tejidos con una localización especial en riñón, hígado, corazón, músculos esqueléticos y pulmón **(Marotto et al., 2010)**. Estos microorganismos son resistentes a la actividad bactericida del suero normal y en ausencia de anticuerpos específicos no son fagocitados, ni destruidos por los polimorfonucleares o macrófagos **(Chierakul et al., 2008)**.

La leptospirosis puede considerarse una enfermedad sistémica, entidad que se traduce principalmente como una vasculitis infecciosa donde predomina la lesión vascular de tipo capilar, daño responsable del edema y la diátesis hemorrágica, que afecta fundamentalmente a los capilares del hígado, del pulmón y el riñón **(Rocha et al., 2010)**. El gran daño tisular, en presencia de pocos microorganismos, sugiere la mediación de factores tóxicos de la espiroqueta y del hospedero, además hace pensar que muchos de los aspectos de la enfermedad son ocasionados por productos tóxicos liberados por la bacteria. Durante la fase aguda, la migración de bacterias, toxinas, enzimas o productos antigénicos liberados a través de la lisis bacteriana, conducen a una permeabilidad vascular aumentada, manifestación más precoz y constante de la enfermedad **(Asuthkar et al., 2007)**.

Las lesiones celulares de los diversos órganos tienen como base patogénica estos mismos factores que actúan inicialmente sobre la membrana celular, adicionada a una eventual hipoxemia derivada del daño vascular. Sin embargo, hasta la actualidad no existe evidencia de una toxina clásica secretada por las leptospiras; de hecho, en los riñones de curieles infectados experimentalmente, el daño endotelial está asociado con la presencia de células de leptospiras **(Silva et al., 2008)**. En cambio se ha demostrado que parte de la habilidad de estos microorganismos para invadir las células Vero e inducir la apoptosis en los macrófagos, se correlaciona con su virulencia **(Xue et al., 2009)**. La respuesta inmunológica está implicada en la patogénesis de la leptospirosis a través de la formación de inmunocomplejos, la liberación de citoquinas y la generación de una vasculitis autoinmune. Así los signos

y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático, aparecen en la fase inmune cuando las aglutininas específicas comienzan a detectarse **(Cinco et al., 2006)**.

### **FACTORES DE VIRULENCIA**

Entre los factores de virulencia presentes en las leptospiras patógenas se han encontrado proteínas de superficie, las cuales se ha pensado que modulan la interacción entre la bacteria y tejidos hospederos; enzimas degradativas; sistemas que promueven la motilidad, la adquisición de hierro y daño tisular **(Ko et al. 2009)**. Las leptospiras patógenas han demostrado expresar adhesinas, hemolisinas y muchos lipoproteínas prominentes en la leptospirosis **(Ristow et al., 2007)**. No existe evidencia de alguna vía de secreción para la inoculación de proteínas en las células del hospedero, como sistemas de secreción tipo III y tipo IV **(Ko et al., 2009)**. Para muchos microorganismos intracelulares, la adhesión es el primer paso en su patogénesis y la posterior invasión de las células del hospedero es un mecanismo eficaz para escapar de la respuesta inmune. Se ha planteado la hipótesis de que la capacidad de adherirse a la superficie celular desempeña un papel importante en la patogénesis de las leptospiras. Sin embargo, los intentos previos realizados por otros investigadores para abordar esta cuestión han arrojado resultados confusos. Por ejemplo, **Merien et al., (1997)** demostraron que *L. interrogans* se une a las superficies celulares y posteriormente invaden las células hospederas, mientras que **Barocchi et al., (2002)** informó que las leptospiras patógenas residen transitoriamente en el citoplasma. Las leptospiras patógenas tienen la capacidad de adhesión a las células. Se postula que hay ligandos para los receptores de adhesión asociados a las leptospiras y que están presentes en los macrófagos. Por lo tanto, es posible que las leptospiras se unan a diferentes células, dando como resultado acontecimientos de internalización, un mecanismo que puede ser fundamental para su capacidad de invadir células del hospedero. La adhesión de las leptospiras patógenas es a través de fagosomas, estas a su vez dentro del fagosoma mantienen su morfología fisiológica. La residencia temporal dentro de un fagolisosoma estimula

una respuesta de las leptospiras con el medio ambiente intracelular que facilita su supervivencia y replicación a largo plazo **(Yunying et al., 2007)**

Los estudios sugieren que la membrana exterior de leptospira tiene un perfil relativamente complejo de proteína. Se presenta evidencia de que LipL32 se expresa durante la infección de mamíferos **(Ristow et al., 2007)**.

El género *Leptospira* sp. exhibe una amplia diversidad genética entre genes para hemolisinas. Las hemolisinas son factores clave de virulencia, y también hay la posibilidad de que la hemolisina juegue un papel en la adquisición de nutrientes **(Chadha et al., 2012)**. El acoplamiento de hemólisis con la utilización de hemo podría servir como una estrategia de adquisición de hierro eficaz que ayudaría en la progresión de la infección. Uno de los más prominentes factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de la leptospirosis son las hemolisinas. Las hemolisinas son las toxinas citolíticas que se encuentran en una variedad de organismos tales como la toxina alfa (*Clostridium perfringens*), fosfolipasas, toxina delta (*Staphylococcus aureus*) y la hemolisina termoestable (*Pseudomonas aeruginosa*) **(Chadha et al., 2012)**.

Las hemolisinas en *Leptospira* sp. se consideran como fosfolipasas que actúan sobre los eritrocitos y otras membranas celulares que contienen los fosfolípidos de sustrato. Así la hemolisina SPHH puede causar daños en la membrana de los eritrocitos y las células y pueden desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de la leptospirosis. **Lee et al., (2002)** han demostrado que el mecanismo citotóxico de SPHH en *L. interrogans* es debido a la formación de poros en varias células **(Lee et al., 2002)**.

La colagenasa es una enzima invasiva común, que juega un papel importante en la invasión de bacterias especies patógenas de leptospira tienen potente invasividad, lo que permite al patógeno para invadir rápidamente al cuerpo humano y extenderse a órganos internos. Estudios previos revelaron que las cepas patógenas de leptospira podrían transmigrar a través del endotelio vascular y las monocapas de células epiteliales renales. Estos datos indican que la

invasividad se requiere por especies patógenas de leptospira para causar la enfermedad (**Kassegne et al., 2012**).

Varias especies patógenas de leptospiros han demostrado que poseen un único gen que codifica la colagenasa-(ColA), pero la actividad de la colagenasa del producto del gen no se ha caracterizado (**Robbin et al., 2015**).

## **MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Las formas más leves de leptospirosis consisten en un cuadro clínico seudogripal, que generalmente presenta cefalea frontal intensa y fiebre. Son igualmente frecuentes las mialgias, especialmente en sitios como las pantorrillas, dolor en el abdomen y la espalda (**Maris et al., 2011**). A las formas más graves de leptospirosis se les conoce con el nombre de síndrome de Weil, y suelen cursar con ictericia, disfunción renal y diátesis hemorrágica. Estas infecciones se presentan con cuadros similares a los de las leptospirosis leves. Sin embargo, alrededor de una semana después del inicio, tras producirse una defervescencia parcial o no, se desarrollan las manifestaciones que caracterizan a estas formas más graves (**Roca et al., 2009**).

La ictericia suele ser intensa, aunque no suele acompañarse de necrosis hepatocelular, ni de insuficiencia hepática. A la exploración médica el paciente suele presentar hepatomegalia (dolorosa) y no es rara la esplenomegalia. La afección renal consiste generalmente en una insuficiencia renal avanzada (**Roca et al., 2006**).

En algunos brotes de leptospirosis predomina la afección pulmonar, consistente en tos, disnea, dolor torácico y hemoptisis, relacionados con hemorragias parenquimatosas pulmonares. Otras manifestaciones más raras son: hemólisis, miocarditis, pericarditis, shock, coagulación intravascular diseminada y fracaso multiorgánico (**Roca et al., 2006**).

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leptospirosis comprende el diagnóstico clínico, bacteriológico, serológico y molecular. Es frecuente observar leptospiras patógenas en los productos patológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo) **(Carrada et al., 2005)**.

Estas bacterias se cultivan en medios artificiales constituidos por una solución de sales minerales y aminoácidos a los que se añade suero de conejo (medios de Fletcher y Stuart), o albúmina bovina con Tween 80 (medio de Ellinghausen, Mccullogh, Harris y Johnson o EMJH). La incubación se realiza a 28-30°C. Debido a su lento desarrollo, sólo se observa crecimiento después de transcurrida una semana. Sin embargo, no debe considerarse el cultivo como negativo sino hasta transcurrido un mes. En los medios semisólidos, el desarrollo se inicia a 1-2 cm de la superficie **(Carrada et al., 2005)**.

La microaglutinación (MAT), es la prueba de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Presenta una sensibilidad variable dependiente del número de serovares probados en el panel de evaluación serológica y de la inclusión o no de cepas locales; requiere además de sueros pareados para la detección de la seroconversión (que es el parámetro de confirmación de caso). Una de las dificultades de la prueba de MAT es la determinación del punto de corte que permita la correcta interpretación de los resultados serológicos obtenidos por esta prueba. El punto de corte más utilizado es 1:100 para hospederos susceptibles, pero no siempre resulta adecuado para poblaciones donde se presente alta o baja endemicidad de leptospirosis **(Fernández et al., 2012)**.

Las técnicas moleculares más utilizadas son las que se realizan mediante la detección de genes propios de especies patógenas o especie específica; son rápidas, sensibles y específicas pudiendo utilizarse para la identificación de la enfermedad en estadios tempranos de la misma. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene la capacidad de amplificar de forma exponencial y específica

una secuencia determinada del DNA. Para ello se emplean dos tipos de iniciadores con una especificidad de 95,2% **(Fernández et al. 2012)**.

### ***LipL32***

En los últimos años se ha reportado la detección de leptospiras patógenas a través de métodos moleculares (basados en la PCR). Se ha descritos diferentes iniciadores para su detección, usando una variedad de genes como blanco de amplificación, incluyendo *flaB*, *OmpL1*, *secY*, *Lig*, *gyrB* y *LipL32*, los cuales están conservados entre las especies patógenas del género *Leptospira* sp. **(Moreno et al. 2010)**.

En relación a *LipL32*, ésta es una lipoproteína importante en la patogénesis de la enfermedad debido a que es abundante en la superficie de la membrana externa de las especies de leptospira patógenas, siendo evidente su alta capacidad inmunogénica **(Zuerner et al., 1991)**. Se encuentra anclada a la membrana citoplasmática de la bacteria **(Haake et ál., 2000)**. *LipL32* tiene una masa molecular de aproximadamente 26.7 kDa. El gen estructural *LipL32* consta de 816 bases que codifican un proteína de 272 aminoácidos **(Haake, 2004)**. Los hallazgos recientes demuestran que *LipL32* es el antígeno dominante durante la respuesta inmune a la leptospirosis (en humanos), mostrando la mayor sensibilidad y especificidad en pacientes con la enfermedad, ya sea en fase aguda o convalecientes **(Hauk, 2008)**.

Se considera que la *LipL32* está involucrada en la patogénesis de la leptospirosis a través de la matriz extracelular, posiblemente debido a que los elementos presentes en la porción C-terminal con proteínas ortólogas de *LipL32* funcionan como dominios de unión de la matriz extracelular en diferentes bacterias **(Hauk, 2008)**.

La lipoproteína de *LipL32* es la más abundante proteína de membrana externa de las especies patógenas de *Leptospira* sp. Se ha asumido que *LipL32* juega un papel importante en las infecciones por las siguientes razones:

- ✓ Se encuentra sólo en las especies patógenas de *Leptospira* sp. Especies no patógenas como *L. biflexa* carecen de la codificación del gen *LipL32*.

- ✓ Se ubica en la superficie de las leptospiras, por lo que la proteína está disponible para interactuar directamente con las células del hospedero.
- ✓ Se une (al menos débilmente) a varios componentes de la matriz extracelular. En pacientes con leptospirosis generan una fuerte respuesta de anticuerpos contra LipL32.
- ✓ La secuencia de la proteína de LipL32 entre las diferentes especies leptospiras patógenas es casi idéntica.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se sabe que el agua es un medio en el cual pueden establecerse microorganismos y es el principal vehículo de diseminación para las leptospiras patógenas, por lo que podría suponerse que cualquier manto acuífero tiene las condiciones apropiadas para que pueda desarrollarse. En la ciudad de Puebla se encuentran diversas fuentes de agua de uso común, donde pudieran estar presentes estas bacterias debido a que la contaminación del agua es un problema frecuentemente en los países en vías de desarrollo, en especial en la época de lluvias donde los sistemas de alcantarillado no son eficientes. Otro de los factores es la acumulación de basura y el aumento desmedido de animales callejeros (perros, gatos, etc.) y de roedores (como las ratas), en las ciudades, ha dado lugar a una gran variedad de zoonosis y de infecciones emergentes que en años atrás no se presentaban en las áreas urbanas. Otro factor importante es la falta de medidas sanitarias y de desinfección, así como el tratamiento de aguas residuales, lo que conlleva a la contaminación de los mantos acuíferos y de las lagunas con que cuentan las ciudades. Todo lo anterior propicia el desarrollo de bacterias patógenas en el agua. Por lo tanto, en esta investigación se propuso llevar a cabo la búsqueda de leptospira patógena en diferentes ambientes acuáticos como lagos y lagunas de la Ciudad de Puebla.

## JUSTIFICACION

La leptospirosis es una infección emergente que ha incrementado el número de casos de manera importante a nivel mundial. Debido a su sintomatología que es muy vaga, en muchos de los casos pasa desapercibida e inclusive, es mal diagnosticada. En años anteriores se han reportado de 0.6 a 2.1 casos por 10,000 habitantes en nuestro país. Se sabe que el cambio climático ha contribuido favorablemente en la aparición de leptospirosis, sobre todo cuando hay desbordamientos de ríos o de lagunas contaminadas con leptospiras patógenas.

Inicialmente se consideró a la leptospirosis como una enfermedad sólo presente en ganado; sin embargo, al pasar de los años se ha observado que se trata de una zoonosis de la cual poco se ha estudiado en humanos. Así en las ciudades de los países en vías de desarrollo, las ratas, los ratones, etc., son los reservorios más importantes para la transmisión de esta enfermedad y la orina de estos animales es el medio que favorece la diseminación de la bacteria. De igual forma, el hecho de que la leptospirosis puede ser confundida con dengue, salmonelosis, influenza, etc, ya que comparten muchos signos y síntomas, lo que hace que esta enfermedad sea sub-diagnosticada y muchas veces confundida por el personal médico.

Por ello, este trabajo fue realizado con la finalidad de detectar leptospira patógena a partir de diferentes fuentes de agua de uso en común y recreativo de la Ciudad de Puebla, lo cual es importante ya que aporta información acerca del papel del agua como posible vehículo para la transmisión de la bacteria.

## HIPÓTESIS

H<sub>0</sub>: La leptospira patógena está presente en diferentes lagunas de la Ciudad de Puebla y es detectable a través de la amplificación por PCR del gen *lipL32*.

H<sub>1</sub>: La leptospira patógena no está presente en diferentes lagunas de la Ciudad de Puebla y no es detectable a través de la amplificación por PCR del gen *lipL32*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de leptospira patógena en muestras de agua de lagunas y lagos de la Ciudad de Puebla, en épocas de lluvia y sequía.

.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Determinar la presencia del gen *LipL32* presente en especies patógenas del género *Leptospira* sp. a partir de diferentes muestras de agua de laguna y lagos de la ciudad de Puebla.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Para el presente estudio se utilizaron muestras de agua provenientes de diferentes lagunas de la ciudad de Puebla.

### **SITIOS DE MONITOREO**

Las muestras de agua fueron tomadas en frascos estériles a partir de diferentes lagunas de la ciudad de Puebla. Se incluyeron algunos lugares como la laguna de San Baltazar, Laguna de Chapulco, lago del Parque Ecológico, lago del jardín Botánico BUAP y lago de Valsequillo. Las muestras de agua fueron tomadas en época de lluvia y de sequía.

#### **1. Laguna de San Baltazar**

Se realizó la toma de muestras de agua en frascos estériles de 1000 mL en 4 sitios diferentes de la Laguna de San Baltazar: centro del lago, en el muelle y las orillas.

#### **2. Laguna de Chapulco**

Se realizó la toma de muestras de agua en frascos de 1000 mL en 4 sitios diferentes: alrededores de la laguna, abajo del muelle y en las escaleras principales (donde se apreciaba movimiento del agua).

#### **3. Lago del Parque Ecológico**

Se realizó la toma de muestra de agua en frascos estériles de 1000 mL. Se monitorearon diferentes sitios del lago del Parque: centro del lago, en el muelle y en las orillas donde se encontró más actividad de fauna y movimiento del agua.

#### **4. Lago del Jardín Botánico BUAP**

La toma de muestra de agua se realizó con frascos estériles de 1000 mL en 4 sitios diferentes del Jardín Botánico de la BUAP (de acuerdo a los puntos cardinales, en las orillas del lago).

### **5. Lago de Valsequillo**

Se realizó la toma de muestra de agua en frascos estériles de 1000 mL en 4 sitios diferentes de la Presa de Valsequillo (San Baltazar Tetela): dos muestras fueron tomadas en dos diferentes sitios céntricos, ya que la presa consta de diferentes secciones y otras dos muestras fueron tomadas en las orillas de la presa, donde la población realiza labores como pesca y toma de agua para uso común. Esta toma de muestra se tomó en dos periodos diferentes (lluvia y sequía).

## **RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS**

Cada muestra de agua se recolectó en frascos de 1000 mL de boca ancha, estériles y fue transportada al laboratorio en condiciones de refrigeración para su análisis. Para separar el material orgánico así como la basura u otros materiales grandes presentes en el agua recolectada (como plantas, corteza, algas, etc), se llevó a cabo una filtración empleando papel filtro estéril. Posteriormente los microorganismos fueron recolectados mediante vacío utilizando un filtro (membrana de nitrocelulosa) con diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

## **EXTRACCION DEL DNA GENOMICO**

Para la extracción del DNA genómico, las membranas de filtración mencionadas anteriormente, fueron lavadas y colocadas en un tubo cónico de 50 mL, conteniendo 5 mL de solución de Tris-EDTA (50/20 mM). Los tubos se dejaron en refrigeración a 4°C durante toda la noche. A partir de la solución anterior se procedió a realizar la extracción del DNA genómico utilizando el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

## PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando los siguientes iniciadores: LipL32F (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') y LipL32R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), de acuerdo a la metodología reportada por **Moreno y Agudelo-Florez, (2010)**. Los oligos amplificaron una región del gen *lipL32*. Esta secuencia está altamente conservada en las especies patógenas de *Leptospira* sp. El perfil térmico para esta PCR fue: temperatura de desnaturalización, 95 °C durante 5 minutos; 94 °C durante 1 minuto; 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante dos minutos; fase de 35 ciclos. Posteriormente, una fase de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. La mezcla de reacción (35 µL volumen final) contenía: 3.5 µL de buffer de PCR, 4.2 µL de MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 3.5 µL de cada uno de los iniciadores a una concentración 0.1 µM; se empleó 0.1 µL de dNTPs, 0,3 µL de Taq-polimerasa a una concentración de 1U y 5 µL de DNA molde. Como control positivo, se utilizó DNA de una cepa de leptospira patógena (*L. interrogans* Pomona).

## ELECTROFORESIS

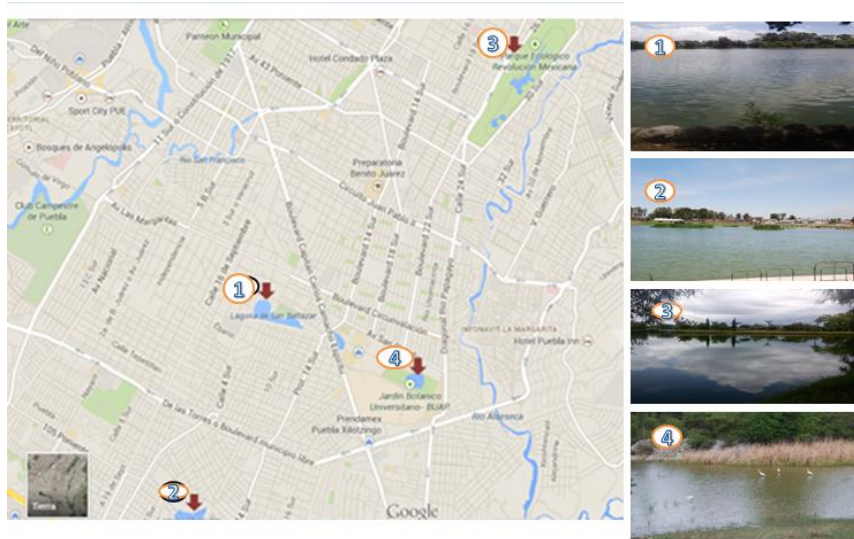
Todos los productos de la PCR obtenidos se visualizaron utilizando bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1.5%. El tamaño del producto de PCR fue de 426 pb. Para ello, se utilizó un buffer TBE (Tris-Base, EDTA, ácido bórico) a una concentración 1X y se usó un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder). La corrida electroforética se llevó a cabo a 80V durante 90 minutos en una cámara de electroforesis horizontal.

## ESQUEMA DE TRABAJO

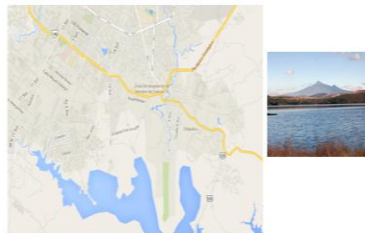


## RESULTADOS

Para este estudio fueron monitoreados los siguientes sitios: laguna de San Baltazar, laguna de Chapulco, lago del Parque Ecológico, lago del jardín Botánico BUAP y lago de Valsequillo. Los sitios fueron monitoreados en época de lluvia y de sequía. En la **Fig.1 y Fig. 2** se muestra el aspecto de los sitios donde fueron tomadas las muestras de agua.



**Fig.1** Sitios de monitoreo: 1) Laguna de San Baltazar, 2) Lago de Chapulco, 3) Laguna del Parque Ecológico y 4) Lago del Jardín Botánico de la BUAP.

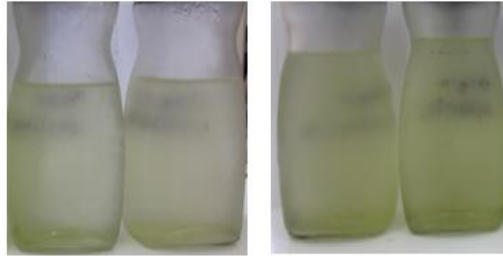


**Fig. 2** Ubicación del lago de Valsequillo.

A continuación se describen algunas características presentadas por el agua obtenida por cada sitio de monitoreo.

### Laguna de San Baltazar

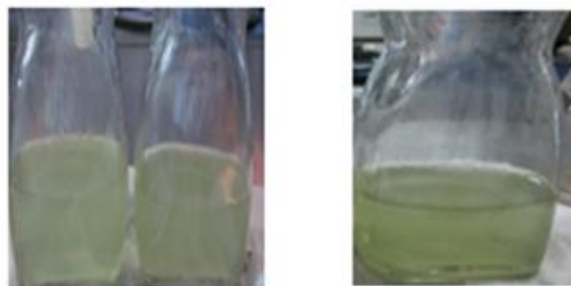
El agua de la laguna tenía una coloración verdosa y con pocos restos de basura, sin olor característico; presentó un pH entre 6.5 a 7.0. La temperatura varió entre 15 a 17 °C (durante el periodo de lluvia). Durante el periodo de sequía, el agua de la laguna tuvo una coloración más verdosa y con muchos restos orgánicos, sin olor característico; el pH registró un valor de 6 a 6.5. La temperatura fue de 17 a 22 °C (**Fig. 3**).



**Fig.3** Muestra de agua tomadas en la Laguna de San Baltazar durante el tiempo de lluvia (izquierda) y tiempo de sequía (derecha).

#### **Laguna de Chapulco**

El agua de la laguna de Chapulco presentó una coloración verdosa y pocos restos de basura, sin ningún olor característico, valor de pH entre 6.0 a 6.5. La temperatura entre 13 a 15° C, durante la época de lluvia. Mientras que en la época de sequía tenía una coloración muy verdosa, turbia, con muchos restos orgánicos y el nivel de agua disminuyó considerablemente. Sin ningún olor característico y presentó un pH en intervalo de 6 a 6.5. El agua registró una temperatura entre 17 a 22°C (**Fig. 4**).



**Fig.4** Muestras de agua tomadas en la Laguna de Chapulco durante el tiempo de lluvia (izquierda) y tiempo de sequía (derecha).

### **Lago del Parque Ecológico**

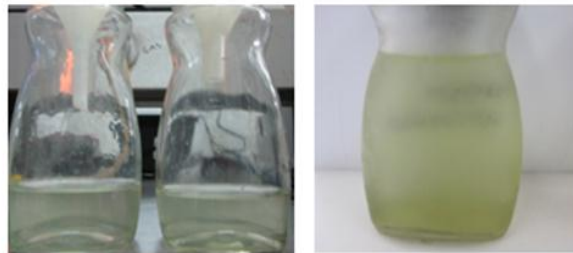
Durante el periodo de lluvia, el agua recuperada presentó una coloración verdosa, con pocos restos de basura, sin olor característico; el pH del agua registró un valor de 6.5 a 7.0. La temperatura varió entre 15 a 17 °C. Durante el periodo de sequía, el agua de la laguna mostró coloración muy verdosa, con muchos restos de basura, sin ningún olor, el pH registró un valor de 5.5 a 6.5. La temperatura del agua fue de 17 a 22 °C. (**Fig. 5**).



**Fig.5** Muestra de agua tomadas en el lago del Parque Ecológico durante el tiempo de lluvia (izquierda) y tiempo de sequía (derecha).

### **Lago del Jardín Botánico BUAP**

Los resultados indicaron que el agua (durante el periodo de lluvia) era translúcida, sin olor característico; presentó un valor de pH entre 6.5 a 7.0. La temperatura varió entre 12 a 15 °C. Durante el periodo de sequía, el agua de la laguna tuvo una coloración turbia, con presencia de tierra y con muchos restos orgánicos, con un olor no identificado, presentó un pH entre 6.0 a 6.5. La temperatura presente fue de entre 17 a 22°C. (**Fig. 6**).



**Fig. 6** Muestras de agua tomadas en el lago del Jardín Botánico durante el tiempo de lluvia (izquierda) y tiempo de sequía (derecha).

### **Lago de Valsequillo**

El agua del lago de Valsequillo presentó un aspecto turbio, con presencia de tierra y basura, sin olor característico; el valor de pH presentó un valor entre 6.5 a 7.0. La temperatura varió entre 15 a 17° C (época de lluvia). Durante el periodo de sequía, el agua de la laguna tuvo un aspecto muy turbio y presencia de muchos restos orgánicos, con olor característico; presentó un pH entre 6 a 6.5. La temperatura varió entre 17 a 22°C (**Fig. 7**).



**Fig.7** Muestras de agua tomadas en el lago de Valsequillo durante el tiempo de lluvia (izquierda) y tiempo de sequía (derecha).

### **RECUPERACIÓN MASIVA DE LOS MICROORGANISMOS DEL AGUA**

Las muestras de agua de cada uno de los sitios monitoreados, fueron procesadas en el laboratorio, primero para retirar todo el material orgánico en suspensión y luego, para recuperar a todos los microorganismos en el agua. La separación del material orgánico se llevó a cabo mediante filtración con ayuda de papel filtro estéril (**Fig. 8**). Con este procedimiento las muestras de agua se tornaron más claras, aunque con coloración verdosa. Luego, las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 5,000 r.p.m durante 10 min para recuperar el material orgánico que no se pudo retirar con el primer filtrado.



**Fig. 8** Proceso de filtración del agua para eliminar el material orgánico.

Posteriormente, las muestras obtenidas fueron sometidas a filtración a vacío (utilizando membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ ). Luego de la filtración a vacío, la membrana fue retirada y guardada a  $-40^\circ\text{C}$  hasta su uso (**Fig. 9**).

Como se puede apreciar en la imagen derecha de la Fig. 9, la membrana de filtración presentó una colocación característica, correspondiente a los microorganismos que fueron recuperados a partir de las muestras de agua de cada sitio monitoreado. Aunque no se pesó la masa celular obtenida, los resultados indicaron que una gran cantidad de microorganismos estaban en suspensión en las muestras de agua analizadas.



**Fig. 9** Recuperación de los microorganismos utilizando un sistema de vacío.

## **DNA OBTENIDO A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE AGUA**

Para la extracción del DNA genómico, las membranas de filtración mencionadas anteriormente, fueron lavadas y colocadas en un tubo cónico de 50 mL,

conteniendo 5 mL de solución de Tris-EDTA (50/20 mM). Los tubos se dejaron en refrigeración a 4°C durante toda la noche. A partir de la solución anterior se procedió a realizar la extracción del DNA genómico utilizando el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La concentración de DNA obtenido se determinó utilizando la siguiente relación:

$$\text{Conc. DNA muestra (ng/}\mu\text{l)} = 260 \text{ Absmuestra} \times (50\text{ng/}\mu\text{l}) \times (100/2).$$

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**. Como se puede observar en la Tabla 1, a la izquierda se presentan las concentraciones de DNA determinadas a partir de las muestras de agua obtenidas durante el periodo de sequía. Los resultados obtenidos indicaron que en todos los casos fue posible cuantificar el DNA registrando valores de concentración importantes: de 50 a 470  $\mu\text{g/}\mu\text{L}$ . Lo mismo ocurrió con las muestras de agua que fueron analizadas durante la época de lluvia (a la derecha). Sin embargo, los valores obtenidos referentes a las concentraciones de DNA fueron menores que las obtenidas a partir de las muestras de la época de sequía (30 a 187  $\mu\text{g/}\mu\text{L}$ ) (**Tabla 1**).

Lo anterior pudo atribuirse a que en la época de lluvia se diluyó la cantidad de microorganismos presentes en el agua analizada y en el periodo de sequía, ocurrió lo contrario.

## **DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA POR AMPLIFICACIÓN DEL GEN**

### ***LipL32***

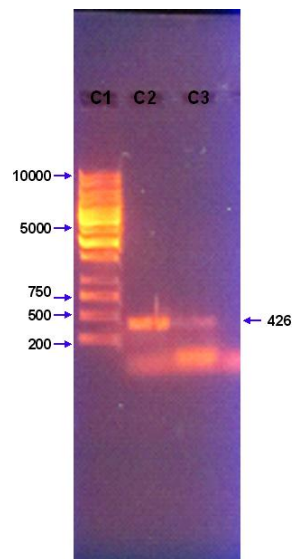
Una vez obtenido el DNA genómico de cada una de las muestras de agua, se procedió a realizar la PCR utilizando los iniciadores LipL32f (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') y LipL3R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3') (como se indicó en la sección de Materiales y Métodos).

**Tabla 1.** Concentración de DNA en dos periodos: sequía (izquierda) y lluvia (derecha).

PERIODO DE SEQUIA				PERIODO DE LLUVIA			
Sitio de monitoreo	ng/μl	Sitio de monitoreo	ng/μl	Sitio de monitoreo	ng/μl	Sitio de monitoreo	ng/μl
Laguna de San Baltazar 1 <sup>a</sup>	237.5	Ecológico4A	155	Laguna de San Baltazar 1B	120	Ecológico4B	132
Laguna de San Baltazar 2A	470	Jardín Botánico 1A	200	Laguna de San Baltazar 2B	35	Jardín Botánico 1B	120
Laguna de San Baltazar 3A	100	Jardín Botánico 2A	77.5	Laguna de San Baltazar 3B	70	Jardín Botánico 2B	30
Laguna de San Baltazar 4A	107.5	Jardín Botánico 3A	55	Laguna de San Baltazar 4B	135	Jardín Botánico 3B	45
Chapulco 1A	125	Jardín Botánico 4A	65	Chapulco 1B	100	Jardín Botánico 4B	33
Chapulco 2A	50	Valsequillo 1A	217.5	Chapulco 2B	32	Valsequillo 1B	187.5
Chapulco 3A	95	Valsequillo 2A	235	Chapulco 3B	77.5	Valsequillo 2B	95
Chapulco 4A	83	Valsequillo 3A	130	Chapulco4B	55	Valsequillo 3B	25
Ecológico 1A	187	Valsequillo 4A	110	Ecológico 1B	100	Valsequillo 4B	55
Ecológico 2A	205			Ecológico 2B	95		
Ecológico 3 <sup>a</sup>	237.5			Ecológico3B	87.5		

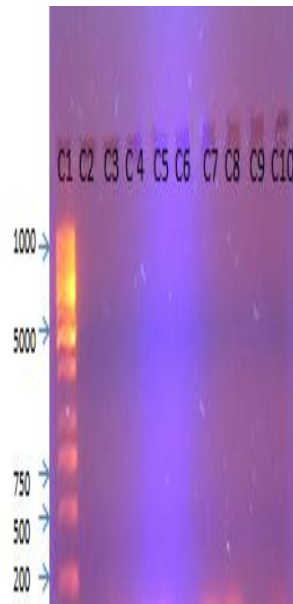
Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%, aplicando 10  $\mu$ L del producto de PCR. La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante 90 min. Las bandas fueron visualizadas exponiendo el gel de agarosa a luz ultravioleta.

Como se muestra en la **Fig. 10**, los carriles 2 y 3 corresponden al producto de PCR esperado para la amplificación del gen *lipL32* de la cepa de *L. interrogans* utilizada como control positivo, mostrando un peso aproximado de 426 pb. En ambos carriles, se puede apreciar la presencia de otras bandas de menor tamaño.



**Fig. 10** Gel de agarosa al 1.5% mostrando un producto de PCR correspondiente al gen *lipL32* para *L. interrogans*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carriles 2 y 3: muestras positivas a leptospira patógena.

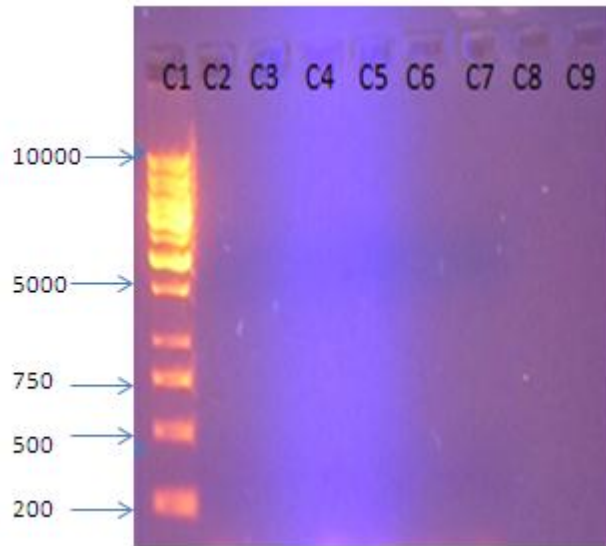
En la **Fig. 11** se presentan los resultados correspondientes a la amplificación del gen *lipL32* a partir de las muestras de agua obtenidas en varios puntos de la Laguna de San Baltazar, de la laguna del Parque Ecológico, laguna del Jardín Botánico BUAP y del lago de Valsequillo. Las muestras fueron recuperadas durante la época de lluvia. Como se puede apreciar en la Fig. 11, en ninguno de los carriles fue posible observar el producto de amplificación esperado, correspondiente a un fragmento de 426 pb.



**Fig. 11** Amplificación del gen *lipL32* a partir de muestras de agua obtenidas en época de lluvia: Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Laguna de San Baltazar; Carril 3: Laguna del Parque Ecológico; Carril 4: Laguna del Jardín Botánico BUAP; Carril 5: Laguna del Parque Ecológico2; Carril 6: Laguna del Parque Ecológico4; Carril 7: Laguna de San Baltazar; Carril 8: Laguna del Jardín Botánico BUAP; Carril 9: Lago de Valsequillo; Carril 10: Lago de Valsequillo2B. .

Por otro lado, en la **Fig. 12** se muestran los resultados obtenidos y que corresponden a la amplificación del gen *lipL32* a partir de las muestras de agua obtenidas en el lago de Valsequillo, en el lago del Parque Ecológico, laguna de San Baltazar y la laguna del Jardín Botánico BUAP. Las muestras fueron recuperadas durante la época de sequía.

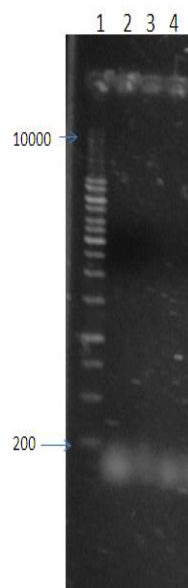
Como se puede apreciar en la **Fig. 12**, en ninguno de los carriles fue posible observar el producto de amplificación esperado, correspondiente a un fragmento de 426 pb.



**Fig. 12** Amplificación del gen *lipL32* a partir de las muestras de agua obtenidas en época de sequía. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Lago de Valsequillo2; Carril 3: Lago de Valsequillo2B; Carril 4: Lago de Valsequillo3B; Carril 5: Laguna del Parque Ecológico2B; Carril 6: Laguna del Parque Ecológico3B, Carril 7: San Baltazar1B; Carril 8: Laguna del Jardín Botánico BUAP2; Carril 9: Laguna del Jardín Botánico BUAP .

Los resultados obtenidos para el agua de la laguna de Chapulco fueron similares a los mostrados anteriormente; además las concentraciones de DNA determinadas para las muestras de agua de esta laguna fueron mucho menores en todos los casos (**Tabla 1**).

Por otro lado, en todos los gels realizados fue común encontrar unas bandas cuyo peso fue menor a 200 pb (datos no mostrados). Se propuso que se trató de la dimerización de los oligonucleótidos empleados. Por ello, se realizó la electroforesis de los oligonucleótidos (reverso y delantero) y de algunos productos de PCR. Como se muestra en la **Fig. 13**, en todos los casos probados se presentó una banda menor a 200 pb, que fue indicativa de la dimerización de los oligonucleótidos utilizados.



**Fig. 13** Gel de agarosa al 1.5% mostrando la dimerización de los oligonucleótidos. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: Oligonucleótido LipL32R; Carril 3: Oligonucleótido LipL32F; Carril 4: producto final de PCR de la muestra del Parque Ecológico

## DISCUSIÓN

La leptopirosis es una infección emergente que anteriormente sólo se consideraba asociada a áreas rurales (**Perret et al., 2005**). La prevalencia de la ecología microbiana y las rutas primarias de transmisión de la leptopirosis, permanecen aún inciertas (**Plank et al., 2000**). En los últimos años, varios estudios epidemiológicos en el mundo han sugerido la vía de transmisión acuática, sobre todo en países latinoamericanos, donde se han reportado una alta prevalencia de la bacteria y tasas altas de transmisión de la enfermedad (**Arcos et al., 2005**). Así se han registrado casos de leptopirosis en áreas urbanas y el agua, ha sido el vehículo para la transmisión de las leptospiras patógenas (**Perret et al., 2005**). Se ha reportado que las leptospiras patógenas pueden permanecer en el agua por largos periodos de tiempo, por ejemplo: *L. interrogans* posee un tiempo de supervivencia superior a 98 días en agua, nutriéndose de la materia orgánica ahí presente (**Alonso et al., 2001; Trueba et al., 2002**). Algunos factores ambientales que contribuyen de manera importante para la sobrevivencia de la bacteria son: la temperatura, el pH, el clima, el estado de contaminación, la presencia de nutrientes ahí presentes (**Cabrera et al., 2007**).

En este estudio se realizó la toma de muestras de agua a partir de varias lagunas ubicadas en las cercanías de la ciudad de Puebla, con el propósito de detectar leptospira patógena mediante la amplificación del gen *lipL32*. Así las muestras de agua fueron obtenidas de la laguna de San Baltazar, laguna de Chapulco, laguna del Parque Ecológico, del jardín Botánico BUAP y lago de Valsequillo. Los sitios fueron monitoreados en época de lluvia y de sequía. Como se describió en la sección de Resultados, todas las muestras de agua presentaron una coloración, olor, pH y temperaturas características, lo cual corresponde a lo que han descrito algunos autores en relación al agua dulce que forma parte de las lagunas y lagos (**Ramírez et al., 2006**). En este estudio, no se realizó ningún aislamiento microbiológico, sin embargo la presencia de microorganismos fue determinada indirectamente mediante la detección de DNA en las muestras de agua analizadas

(**Tabla 1**). Estudios realizados por algunos autores, han demostrado que la laguna de Valsequillo presenta en sus aguas, grandes cantidades de bacterias de importancia médica (**Bonilla et al., 2005**). Entre ellas se puede citar a: *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *V. cholerae*. Como se pudo apreciar en la **Tabla 1**, en todas las muestras fue posible cuantificar DNA. En algunas lagunas, la concentración de DNA fue mayor que en otras. Además, hubieron diferencias importantes entre la época de lluvia y la época de sequía. En ésta última, las concentraciones de DNA fueron mayores como era de esperarse.

Por otro lado, se procedió a realizar la PCR utilizando los iniciadores descritos en la sección de Materiales y Métodos, que amplificaron una región del gen *lipL32*, secuencia altamente conservada entre las especies patógenas de *Leptospira* sp. Como se pudo apreciar en las **Fig. 11** y **Fig. 12**, en ninguno de los casos se registró la amplificación del gen *lipL32* presente entre las leptospiras patógenas, lo cual sugirió que ninguna de las muestras de agua analizadas obtenidas de las lagunas de la ciudad de Puebla contenía estas bacterias. Este resultado fue observado tanto en las muestras de agua recolectadas en la época de lluvia como en época de sequía. Lo anterior resultó relevante ya que fue indicativo de que el agua de las lagunas monitoreadas carecen de leptospiras patógenas. Seguramente son portadoras de otro tipo de microorganismos patógenos, pero no de leptospiras dañinas. Como se sabe, las leptospiras patógenas pueden sobrevivir por muchos meses en ambientes húmedos, principalmente en climas con temperaturas mayores a 22°C y a pH neutro. También se sabe que el crecimiento de las leptospiras patógenas es inhibido en aguas saladas o cuando el pH es ácido (**Solano et al., 1996**). Muy probablemente tanto el pH como la temperatura de las aguas de los sitios analizados no son propicios para el desarrollo de las leptospiras patógenas en Puebla. Los resultados de este estudio mostraron valores de pH ácidos (alrededor de 6 a 6.5 promedio) y la temperatura en ninguno de los casos fue superior a 22°C. Reportes del INEGI indican que la temperatura promedio en la ciudad de Puebla es de 16°C y la temperatura promedio en el Estado de Puebla es de 17.5°C. Tan solo este factor ambiental

debe ser limitante para el crecimiento de las leptospiras patógenas en el agua de las lagunas.

En otras partes del mundo, se han reportado brotes de leptospirosis “accidentales” asociadas a los ambientes acuáticos. Por ejemplo, en 1998 en Springfield, Illinois (EEUU) se registró un brote de leptospirosis entre los competidores de un triatlón y entre los residentes de la comunidad (**Morgan et al., 2002**). En Maran (Malasia) se reportó un brote de leptospirosis asociado al lago recreativo público “Hutan Lipur Lubuk Yu”. Lo anterior fue un caso preocupante para la Salud pública ya que ocasionó tres muertes (**Renacer et al., 2013; Sapian et al., 2012**). Otro ejemplo es el caso presentado en 2011 por dos turistas australianos jóvenes que estuvieron en los canales de Venecia (Italia). Ellos contrajeron la leptospirosis a través de la exposición a suelos y aguas contaminadas (**Lagi et al., 2013**). Se ha reportado que las leptospiras pueden entrar al torrente circulatorio por las mucosas lesionadas, o bien por la piel (inclusive sana) al exponerse al suelo o el agua contaminada (**Bharti et al., 2003; Evangelista y Coburn, 2010**). Por ello, la leptospirosis es también considerada como una enfermedad emergente para los viajeros.

La leptospirosis no sólo puede adquirirse mediante zoonosis (como se consideraba tradicionalmente) y por lo tanto, por el contacto con mamíferos, aves, anfibios, reptiles o sus productos como sangre, tejidos, órganos u orina contaminados con leptospiras patógenas (**Flores et al., 2014**). La rápida urbanización de las ciudades y el inadecuado sistema de gestión de la basura en las áreas urbanas, han creado las condiciones favorables para el desarrollo de los animales portadores de leptospiras patógenas (**Sarkar et al., 2002**).

Por otro lado, es importante comentar que la técnica utilizada en este estudio permitió la amplificación del gen *lipL32* a partir de *L. interrogans*. Como pudo observarse en la **Fig. 10**, se obtuvo un producto de amplificación de 426 pb como fue reportado por **Moreno y Agudelo-Florez, (2010)**. Sin embargo, como se comentó anteriormente, en todos los geles de agarosa realizados se mostraron

otras bandas de DNA de peso molecular menor a 200 pb. La electroforesis en gel de agarosa de los oligonucléidos reverso y delantero, así como de algunos productos de PCR obtenidos, indicaron que se trató de la dimerización de los mismos (manifestándose por las bandas menores de 200 pb). De lo anterior, se pudo concluir que las condiciones utilizadas para la amplificación del gel *lipL32* no fueron las ideales, por lo que se propone buscar otras temperaturas de alineamiento y de extensión en un estudio posterior.

## CONCLUSIÓN

- 1 En las muestras de agua de los sitios seleccionados no se encontró leptospira patógena.
- 2 El agua de los sitios seleccionados aparentemente no es un foco de infección para la leptospirosis, pero sí para otro tipo de enfermedades causadas por bacterias patógenas.

## **PERSPECTIVAS**

1. Se propone modificar las condiciones de trabajo de la técnica de PCR para evitar las bandas que se registraron con un peso menor a 200 pb.
2. Se sugiere incrementar el número de pares de oligonucleótidos para la amplificación de genes relacionados con otras proteínas de superficie de las leptospiras patógenas presentes en aguas de lagunas y lagos.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler B., De la Peña A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Rev. Vet Microb. 140:287-296.
- Alonso C., García J., Pereira J., Costas E., Ortega M. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Rev. Invest. Agr. Pro San Ani. 16:1-34.
- Arcos M., Ávila S., Escupiña S., Gómez A. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. Rev. Nova Pub Cien. 3:68-79.
- Asuthkar S., Velineni S., Stadlmann J., Altmann F., Sritharan M. 2007. Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, hbpa, from *Leptospira interrogans* serovar lai. Rev. Infect. Immun. 75: 4582- 4591.
- Barocchi M., Ko A., Reis M., McDonald K., Riley L. 2002. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. Rev. Infect Immun. 70:6926–6932.
- Bharti R., Nally J., Ricaldi N., Matthias A., Diaz M., Lovett A., Levett N., Gilman H., Willig R., Gotuzzo E., Vinetz M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Rev. Infect. 3:757-771.
- Bonilla F., Cabrera C. 2005. Aislamiento y cuantificación de contaminantes microbiológicos en sedimentos de la presa Manuel Ávila Camacho. Memorias del X Congreso Nacional de Ciencias Básicas. UQR. 757-762.
- Douadi B., Pei Y., Siti N., Fairuz A., Kwai L. 2013. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. Rev. Microb Environ. 28:135-140.
- Cabrera C., Gómez R., Zúñiga A. 2005. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Rev. Col Med. 38: 149-158.
- Carrada T. 2005. *Leptospira* humana. Historial natural, diagnostico y tratamiento. Rev. Mex Pat Clin. 52:246-256.
- Caro J., Zunguina I., Villanueva J. 2010. Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la *Leptospira* en México. Rev. Enf. Infec. Ped. 23:109-111.

- Chadha T., Trindade A. 2012. Analysis of Genetic Diversity of Hemolysins in *Leptospira*. Rev. Prot. Bio. 5(7): 152-154.
- Chierakul W., Tientadakul P., Suputtamongkol Y., Wuthiekanun V., Phimda K. 2008. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. Rev Clin Infect Dis 46:254-260.
- Cinco M., Domenis R., Perticarari S., Presani G., Marangoni A., Blasi E. 2009. Interaction of leptospire with murine microglial cells. Rev New Microbiol. 29(3):193-199.
- Colín J., Caballero A., Alarcón J., Pérez J., Bernal C., Cuellar A. 1997. Estudios sobre leptospirosis en México (1961-1995). Rev. Sal Public. 5:142-150.
- Evangelista V., Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Rev. Microbiol. 5:1413-1425.
- Fasciolo G., Meca MI., Calderón E., Rebollo M. 2005. Contaminación microbiana en ajos y suelos regados con efluentes domésticos tratados. Mendoza (Argentina). Rev. FCA. 37:31-40.
- Flores M., Ramírez A., González B., Carreño R., Cabrera C, García S., Sánchez M., Herrera A., Ixtepan C. 2014. Presence of *Leptospira* in aquatic environments Rev. J Med Clin Scie. 3:80-87.
- Flores J., Suarez G., Francisco MA., Heredia M., Vivas M, Franco J. 1995. Calidad bacteriológica del agua potable en la ciudad de Mérida Yucatán. Rev. Biomed. 6:127-134.
- Goncalves C. 2012. *Leptospira* and inflammation. Rev. Hin Pub Corp. 1:1-11.
- González A., Borrero r., Ruiz J., Batista N., Fernández Y., Valdés y., González M. 2006. Medio modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo *Ballum*. Rev. Arg Micr. 38:6- 68.
- González E., Robles E., González JA., Sifuentes J., Baca M., Martínez B. 2011. Contaminación bacteriana en el agua de unidades de una institución de salud pública. Rev. Odon Ven. 49:1-9.
- Jáuregui C., Rodríguez I., Coronell L., Ramírez S., Padilla R., 2010. Calidad sanitaria del agua potable en San Blas, México. Rev. Inter Cie Amb. 1:1-10.

- Haake, D. A., G. Chao, R. L. Zuerner, J. K. Barnett, D. Barnett, M. Mazel, J. Matsunaga, P. N. Levett, and C. A. Bolin. 2000. The *leptospiral* major outer membrane protein *LipL32* is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Rev. Infect Immun.* 68:2276-2285.
- Haake, D. A., and J. Matsunaga. 2002. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel *leptospiral* membrane proteins. *Rev. Infect Immun.* 70:4936-4945.
- Haake, D. A., M. A. Suchard, M. M. Kelley, M. Dundoo, D. P. Alt, and R. L. Zuerner. 2004. Molecular evolution and mosaicism of *leptospiral* outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *Rev. J Bacteriol* 186:2818-2828.
- Hauk, P; etál. "Structure and Calcium-Binding Activity of *LipL32*, the Major Surface Antigen of Pathogenic *Leptospira sp.*". 2009. *Rev. J Mol Biol.* 390 (4): 722–736.
- Islam M., Drasar B., Sack B. 1994. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*. *Rev. J Dia Dis Res.* 12:87-96.
- Lagi F., Corti G., Meli M., Pinto A., Bartoloni A. 2013. Leptospirosis acquired by tourists in Venice, Italy. *Rev. J Travel Med.* 20:128-130.
- Lee S., Kim S., Park S., Kim M. 2002. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin *SphH* as a pore-forming protein on mammalian cells. *Rev. Infect Immun.* 70: 315-322.
- Kassegne K., Hu W., Sun D., Ge Y., Zhao J., Yang F., Li L., Yan J. 2014. Virulence Factor for Invasiveness and Transmission of Pathogenic *Leptospira* Species. *Rev. J Infec Disea.* 209:1105–1115.
- Kupek E., De Sousa M., Faverasani S. 2000. Relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991-1996. *Rev. Braz J Infec Dis.* 4:131-134.
- Maris S., Rago M. 2011. *Leptospira*: revisión del tema a propósito de dos casos. *Rev. Biom.* 6:38-39.

- Martínez A., Fonseca K., Ortega JL., García C. 2009. Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del río Nazas, México. *Rev. Quí Viv.* 1:35-47.
- Merien F., Baranton G., Perolat P. 1997. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Rev. Infect Immun* 65:729– 738.
- Moreno N., Agudelo P. 2010. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospiras sp.* En Colombia. *Rev. Perú Med.* 27:548-556.
- Morgan J., Bornstein S., Karpati A., Bruce M., Bolin C., Austin C., Woods C., Lingappa J., Langkop C., Davis B., Graham D., Proctor M., Ashford D., Bajani M., Bragg S., Shutt K., Perkins B., Tappero J. 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Rev. Clin Infect Dis.* 34:1593-1599.
- Morroto P., KO A., Murta C., Seguro F, Prado R, Barbosa. 2010. Early identification of leptospirosis associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *Rev. J Infec* 60:218-223.
- Palaniappan U.M., Ramanujam Subbupoongothai., Chang Yung-Fu. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Rev Curr Opin Infect Dis.* 20:284–292.
- Perret C., Abarca K., Dabanch J., Solari V., García C., Carrasco S., Olivares R., Avalos P. 2005. Prevalencia y presencia de factores de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la Región Metropolitana. *Rev. Méd Chile.* 133: 426-43.
- Plank R., Dean D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira sp.* in humans. *Rev. Microbes Infect.* 1265-1276.
- Ramírez D., Serrano R., Sandoval T. 2006. Microorganismos extremófilos. *Actinomicetos halófilos en México Rev. Mex Cie Farm.* 37 (3):56-71.

- Ristow P., Bourhy P., Weykamp F., Pereira C., Huerre M., Ave P., Saint I., Ko A., Picardeau M. 2007 The *OmpA-Like* protein *Loa22* is essential for *Leptospira* virulence. Rev. Pat. 3: 0894- 0903.
- Robbins G., Hahn B., Evangelista K., Padmore L., ArandaP., Coburn J. 2015. Evaluation of cell binding activities of *Leptospira* ECM adhesins. Rev. Neg Tro Dis. 1-16.
- Rocha f., Spichler A., Athanazio D. 2010. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. Rev. Act tro 115:155-162.
- Sapian M., Khairi M., How S., Rajalingam R., Sahhir K., Norazah A., Khebir V., Jamalludin A. 2012. Outbreak of melioidosis and leptospirosis co-infection following a rescue operation. Rev. Med. J. Malaysia 67:293–297.
- Sarkar U., Nascimento S., Barbosa R., Martins R., Nuevo H., Kalafanos I., Grunstein I., Flannery B., Dias J., Riley LW., Reis M., Ko A. 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66:605-610.
- Solano A., Boza R., Sáenz E., 1996. Leptospirosis en Humanos. Rev. Cos Cie Méd. 17:41-60.
- Silva E., Santo C., Athanazio D., Seyffert N., Seixas F., Cerqueira G. 2008. Characterization of virulence of *leptospira* isolates in hamster model. Rev Vaccine. 26:3892-3896.
- Trueba G., Zapata S., Madrid K., Peñafiel N. 2002. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) en al agua dulce. Rev. Cub Med Trop. 54:11-14.
- Vado I., Cárdenas M., Laviada H., Vargas F., Jiménez B., Zavala J. 2002. Estudio de casos clínicos e incidencia de *Leptospira* humana en el estado de Yucatán, México durante el periodo 1988 a 2000. Rev. Biomed.13:157-164.
- Velasco O., Rivas B. 2010. *Leptospira* transmitida del hombre al perro. Rev. Enfer Infec Micro. 30:106-109.
- Velasco O., Rivas B., Sánchez M. Soriano J., Rivera H., Garibay V. 2009. Leptospirosis en México: diagnostico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia. Rev. Mex Patol Clin. 56:157-167.

- Vidal J., Consuegra A., Gomescaseres L., Marrugo J. 2009. Evaluación de la calidad microbiológica del agua envasada en bolsas producida en Sincelejo- Colombia. Rev. MVZ Córdoba. Vol. 14. Pag.1734-1744.
- Xue F., Yan J., Picardeau M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp.*: lessons learned from the genomes. Rev. Microb Infect 11:328-333.
- Yunying L., Wei Z., Liwei L., Yafei M., Jie Y. 2007 Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. Rev. Med Microbiol Immunol. 196:233–239.
- Zavala J., Vado I., Rodriguez M., Rodriguez E., Barrera A, Guzmán E. 1998. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. Rev Biomed. 9:78-83.
- Zamora A., Falabella A., Pérez J., Domínguez S., De Luca L. 2002. Contaminación microbiológica en aguas de pozo. Partido Gral. Pueyrredón. Provincia de buenos aires. Argentina. Rev. Uni. Nac. de Mar de Plata. 1:123-128.
- Zuerner, R; Knudtson,W.; Bolin, C. y Trueba, G. 1991. “Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*”. Microbiol. Pat. 4:311–322.