



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
PATÓGENAS DE *LEPTOSPIRA* EN SANGRE Y ORINA DE
SERES HUMANOS DE CULIACÁN SINALOA”**

TESIS

QUE PRESENTA

LIC. QFB. EFREN ANTONIO RUIZ VERDUGO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTORES

DR. ROGELIO LAGARDE GUERRERO

DR. JOSÉ GUADALUPE RENDÓN MALDONADO

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO A DICIEMBRE DE 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida.

A mis padres quienes me enseñaron a ser perseverante y nunca rendirme.

A mis amigos que siempre han estado ahí cuando lo he necesitado, por escucharme y aconsejarme.

A mi novia, por acompañarme a lo largo de estos años, por todo su amor y cariño.

A todas las personas que se alegran de mis logros, esto es en parte gracias a todos ustedes.

A la vida por enseñarme que de todo se aprende.

En especial, quiero dedicar esta tesis a mí, por no rendirme ante las adversidades que se presentan a lo largo de la vida, estos años han sido de aprendizaje y crecimiento personal, me llena de felicidad el poder estar culminando esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mis directores de tesis. Al Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, por haberme abierto las puertas del laboratorio de microscopía, el cual a lo largo de estos años se convirtió en mi segunda casa, para llevar a cabo este proyecto y por la confianza depositada en mi persona. Al Dr. Rogelio Lagarde Guerrero, por su apoyo incondicional en todo este trayecto, he aprendido mucho de su persona, gracias por no rendirte conmigo. A la Dra. Samantha Benítez y el Dr. Sergio Durán, por su apoyo dentro y fuera del laboratorio. A la Dra. María Navarro por las asesorías brindadas. Me es grato haber compartido estos años con ustedes, hicieron amena mi estancia en el laboratorio, se han convertido en mis amigos, mi familia.

A mis compañeros en el Laboratorio de Microscopía, con los cuales me tocó vivir muchas experiencias junto a ellos.

A mis padres Álvaro y María del Rosario, porque gracias a ellos me convertí en la persona que soy hoy en día, por acompañarme en cada paso que doy, este además de ser logro mío, es logro de ustedes.

A mis hermanas Dámaris y Nubia, por su amor incondicional, por aguantar mis cambios de humor, y a veces no tanto, las amo.

A mis sobrinos Ian Mariano y Alexa Rosario, por llenarme de energía y amor con un abrazo suyo.

A mi novia Amy Félix, por acompañarme en todo momento, por estar ahí para mí cuando más lo he necesitado, por todo lo vivido estos años, por lo que somos y lo que seremos, te amo mi vida, espero seguir compartiendo experiencias contigo, siendo esta una de ellas.

A mis amigos que siempre me brindan sus palabras de aliento, por estar, en las buenas, las malas y en las peores, siempre estaré agradecido con todos ustedes.

A mis amigas Marilu y Deysi, a las que considero mis hermanas, gracias por motivarme a cumplir con mis metas.

A los amigos que hice en el camino, Shirley, Thania, Fernando, Valeria, Carolina, Sonia, Sergio, no me imagino otras personas con las cual haber compartido estas experiencias, no hay desconocidos, solo amigos por conocer, gracias por todo, pero principalmente, por enseñarme que siempre debemos hacer espacio para las cosas importantes.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por mi formación como Maestro en Ciencias Biomédicas.

Extiendo mi gratitud ante el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada, la cual ayudó al desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

I RESUMEN	15
II ABSTRACT	16
III INTRODUCCIÓN	17.
IV ANTECEDENTES.....	19
4.1 Leptospirosis	19
4.2 <i>Leptospira</i>	19
4.3 Etiología de leptospirosis.....	20
4.4 Patogenia	22
4.5 Manifestaciones clínicas.....	26
4.6 Epidemiología	27
4.6.1 Epidemiología mundial.....	28
4.6.2 Epidemiología en México	29
4.6.3 Epidemiología en Sinaloa	29
4.7 Tratamiento	34
4.8 Diagnóstico.....	35
4.8.1 Microscopía de campo oscuro	36
4.8.2 Cultivo	37
4.8.3 Pruebas serológicas.....	38

4.8.4 Diagnóstico molecular	40
V JUSTIFICACIÓN.....	44
VI HIPÓTESIS.....	45
VII OBJETIVOS.....	46
7.1 Objetivo General.....	46
7.2 Objetivos Específicos	46
VIII MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
8.1 Diseño experimental	47
8.2 Recolección de muestra	47
8.3 Metodología	47
8.3.1 Método de extracción de ADN	47
8.3.2 Verificación de integridad del ADN:.....	49
8.3.3 Control interno con gen constitutivo (<i>β-actina</i>):.....	49
8.3.4 Identificación de <i>Leptospira</i> por la amplificación del gen <i>lipL32</i> :.....	50
8.3.5 Identificación de especies patógenas de <i>Leptospira</i> :.....	51
8.3.6 Secuenciación.....	52
8.4 Análisis estadístico	53
IX. RESULTADOS	54
9.1 Descripción de la población.....	54
9.2 Extracción de material genético y verificación de integridad	59

9.3 Amplificación del gen constitutivo <i>β-actina</i>	59
9.4 Identificación de <i>Leptospira</i> por PCR punto final.....	59
9.5 Identificación de especies patógenas de <i>Leptospira</i>	68
9.6 Análisis Estadístico.....	74
X. DISCUSIÓN.....	79
XI. CONCLUSIONES	83
XII. PERSPECTIVAS	84
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	85
XIV ANEXOS	91
XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Ciclo de transmisión de <i>Leptospira</i>	25
2 Leptospirosis a nivel mundial	31
3 Epidemiología de leptospirosis en México	32
4 Casos de leptospirosis en Sinaloa en el año 2023	33
5 Distribución poblacional por sexo	55
6 Manifestaciones clínicas	57
7 Muestras biológicas	58
8 Gel representativo de la extracción de ADN	60
9 Gel representativo de la amplificación del fragmento del gen constitutivo β - <i>actina</i>	61
10 Gel representativo de la amplificación de un fragmento del gen <i>lipL32</i>	62
11 Positividad en la muestra poblacional	63
12 Individuos positivos	64
13 Muestras biológicas positivas	65
14 Positividad en Sangre	66
15 Positividad en orina	67
16 Gel representativo de la amplificación del gen <i>secY</i>	70

17	Alineamiento de secuencias	72
18	Diversidad genética del gen <i>secY</i> del género <i>Leptospira</i>	73
19	Casos positivos y negativos a leptospirosis acorde a los grupos etarios	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Edad poblacional	56
2 Porcentaje de cobertura e identidad	71
3 Análisis de variables clínicas y su relación con la positividad para <i>Leptospira</i>	76
4 Distribución de casos positivos y negativos de <i>Leptospira</i> según los grupos etarios.....	77

I. RESUMEN

Introducción. Leptospirosis es una zoonosis bacteriana que tiene como agente causal especies patógenas del género *Leptospira*. Anualmente se presenta alrededor de 1 millón de casos y cerca de 60,000 muertes a causa de esta enfermedad mundialmente. No obstante, debido a la diversidad de síntomas presentados durante el transcurso de leptospirosis y a la dificultad para su diagnóstico, es probable que los casos reportados se encuentren subestimados. Para ello es necesario el implementar técnicas moleculares, las cuales presentan una mayor sensibilidad y especificidad tanto para la identificación de la presencia de la bacteria, así como su especiación. **Objetivo.** Determinar la frecuencia y especies de *Leptospira* presentes en muestras de sangre y orina de seres humanos con sintomatología compatible con leptospirosis en Culiacán Sinaloa. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal, en el cual se implementó una metodología basada en técnicas de PCR la cual permitió identificar la presencia de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de sangre y orina de humanos. Adicionalmente se realizó un análisis estadístico con los resultados obtenidos mediante el uso de los programas Excel y SPSS Statistics versión 26. **Resultados.** Se analizaron un total de 131 muestras, correspondientes a 70 personas con sintomatología compatible con leptospirosis, y se reporta una frecuencia de 8.9%. Con una positividad del 6% en sangre y 3.3% en orina. Estos resultados muestran la importancia de determinar la infección activa mediante la identificación de genoma bacteriano en las muestras biológicas, lo que contribuye a la decisión del esquema terapéutico para el control de la infección.

(**Palabras clave:** *Leptospira*, leptospirosis, PCR).

II. ABSTRACT

Introduction. Leptospirosis is a bacterial zoonosis that is caused by pathogenic species of the genus *Leptospira*. Annually world level there are about 1 million cases and about 60,000 deaths due to this disease. However, due to the diversity of symptoms presented during the course of leptospirosis and the difficulty in diagnosis, it's probably that the reported cases are underestimated. For this, it is necessary to implement molecular techniques, which offer greater sensitivity and specificity for both the detection of the bacteria and its speciation. **Objective.** Determine the frequency and species of *Leptospira* present in blood and urine samples from humans with symptoms compatible with leptospirosis in Culiacan Sinaloa. **Materials and Methods.** An observational, descriptive, and cross-sectional study was conducted using a PCR-based methodology to identify the presence of pathogenic *Leptospira* species in blood and urine samples from humans. Finally, a statistical analysis of the results was performed using Excel and SPSS Statistics version 26. **Results.** A total of 131 samples were analyzed, corresponding to 70 individuals with symptoms compatible with leptospirosis, revealing a positivity rate of 8.9%. The positivity rate was 6% in blood samples and 3.3% in urine samples. These results highlight the importance of determining active infection by identifying bacterial genome in biological samples, which contributes to the decision-making process for the therapeutic regimen to control the infection.

(Keywords: *Leptospira*, *leptospirosis*, *PCR*).**)**

III. INTRODUCCIÓN

Leptospirosis es una de las zoonosis de mayor prevalencia a nivel mundial, la cual es causada por bacterias del género *Leptospira*, afectando principalmente a personas que viven en climas tropicales y templados, tanto de zonas rurales como urbanas, presentándose principalmente posterior a fuertes lluvias e inundaciones (Rajapakse S., 2022).

Las manifestaciones clínicas comúnmente son similares a las observadas en diversas enfermedades febriles, tal como dengue, infecciones por rickettsiosis, paludismo y sepsis bacteriana, entre otros (Rajapakse S., 2022). La mayoría de individuos infectados presentan fiebre sin alguna otra complicación y aproximadamente el 10% desarrolla una enfermedad grave, presentando sufusión conjuntival, ictericia y lesión renal aguda conocido como síndrome de Weil (Rajapakse S., 2022).

Se estima que, a nivel mundial, anualmente se presentan hasta 1,000,000 de casos de leptospirosis y aproximadamente 60,000 muertes se asocian a ésta enfermedad (Md-Lasim *et al.*, 2021).

La infección es contraída debido a la exposición directa o indirecta con la bacteria presente en alimentos, agua o suelos contaminados con orina de animales infectados, ingresando al organismo a través de abrasiones, cortes en la piel o por vía conjuntiva, además, la infección puede tener lugar a través de la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua (Haake D. *et al.*, 2015).

A partir del año 2000 se inició el registro de leptospirosis en humanos en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), con la finalidad de caracterizar el

panorama epidemiológico de leptospirosis en México. Entre los años 2000 y 2010 los estados con las tasas más altas de casos seropositivos fueron: Campeche, Yucatán, Sonora, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz, Sinaloa, Tabasco, y Veracruz, los serovares más frecuentes aislados fueron: *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. canicola*, *L. ballum*, *L. hardjo*, y *L. pomona*. Para la semana epidemiológica 52 del año 2023 en México se reportaron un total de 285 casos, siendo Sinaloa el estado con mayor número de casos reportados siendo estos 83 casos, seguido de Veracruz con 43 casos y Yucatán con 33 casos.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Leptospirosis

Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución a nivel mundial, causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* (Md-Lasim *et al.*, 2021). Se estima la presencia de un millón de casos y alrededor de 60,000 muertes al año a nivel mundial, lo cual representa un problema de salud pública (Md-Lasim *et al.*, 2021).

4.2 *Leptospira*

El nombre de ésta bacteria proviene del término griego *leptos* (delgado) y del latín *spira* (espiral), son espiroquetas que pertenecen al orden Spirochaetales, la familia Leptospiraceae y al género *Leptospira* (Bautista B. *et al.*, 2019).

Leptospira es una bacteria Gram-negativa, en forma de espiral, aerobia obligada, móvil, de vida libre, con forma helicoidal y extremos en forma de gancho, la cual presenta una longitud entre 6-20 μm y un diámetro aproximado de entre 0,1 y 0.2 μm (Bautista B. *et al.*, 2019).

Crece a una temperatura óptima entre 28-30°C y pH que oscila entre 7.2 y 7.6 (Bautista B. *et al.*, 2019). Mediante análisis filogenético se determinó que *Leptospira spp.* de acuerdo con el nivel de patogenicidad se divide en tres linajes: saprófito, intermedio y patogénico (Bautista B. *et al.*, 2019).

El genoma de *Leptospira* se encuentra compuesto por cromosomas circulares: un cromosoma grande (cromosoma I), y otro pequeño (cromosoma II). El cromosoma I tiene una longitud que varía entre 3500 a 4300 kb, mientras que la longitud del cromosoma II oscila entre 300 y 350 kb. Las especies saprófitas poseen además de éstos 2

cromosomas, un tercer replicón circular de 74 kb, el cual es denominado p74, el cual se ha relacionado con la supervivencia de estas especies en el medio ambiente. (Romero & Falconar, 2016; Picardeau *et al.*, 2008).

El tamaño del genoma de *Leptospira* varía en función de la especie, el de *Leptospira interrogans* es de 4627 kb, el de *Leptospira borgpetersenii* de 3931 kb y el de *Leptospira biflexa* de 3956 kb, a pesar de las variaciones presentes entre las especies, éstas comparten 2052 genes (Ospina & Hernández, 2015).

La diferencia en el tamaño del genoma de *Leptospira*, refleja la información genética adicional que requiere *Leptospira interrogans* para vivir tanto en el hospedero como en condiciones de vida libre, a su vez, la reducción del tamaño del genoma de *Leptospira borgpetersenii* demuestra la evolución que tiene hacia un ciclo de transmisión estricto de hospedero a hospedero (Romero & Falconar, 2016).

De acuerdo a la literatura, se propone que los 1431 genes que se encuentran presentes en las especies patógenas, como por ejemplo en las especies *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii*, podrían codificar proteínas asociadas a la virulencia de la bacteria, sin embargo, la función en el 62.4 % (893) de ellos es desconocida (Romero & Falconar, 2016).

4.3 Etiología de leptospirosis

Mediante el análisis filogenético, basado inicialmente en la secuenciación del gen 16S rRNA, se mostró que el género se encuentra clasificado en dos clados: “saprofito”, en el cual se encuentran especies presentes de manera natural en el ambiente, además de no ser responsables de infecciones y “patógeno” en el cual se encuentran las especies

responsables de infecciones tanto en humanos como en animales, así mismo, se encuentran especies ambientales para las cuales la patogenicidad aún no se encuentra esclarecida (Picardeau M., 2020).

Estos clados a su vez se encuentran subdivididos en subclados, siendo estos: P1, P2, S1 y S2.

Las especies patógenas se subdividen en subclados P1 y P2.

En el subclado P1 se encuentran 17 especies patógenas: *L. mayottensis*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. alstonii*, *L. adleri*, *L. barantonii*, *L. ellisii*, *L. dzianensis*, *L. gomenensis*, *L. putramalaysiae*, *L. tipperaryensis*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weillii* (Picardeau M., 2020).

Algunas de las especies mencionadas en este subclado fueron identificadas por primera vez en el medio ambiente, además no se han aislado de animales o pacientes infectados, lo cual sugiere que se pueden considerar patógenos no verdaderos, estas especies son: *L. kmetyi*, *L. adleri*, *L. ellisii*, *L. gomenensis*, *L. barantonii*, *L. dzianensis* y *L. putramalaysiae* (Picardeau M., 2020).

En el subclado P2 se encuentran 21 especies patógenas intermedias: *L. broomii*, *L. licerasiae*, *L. fainei*, *L. venezuelensis*, *L. wolffii*, *L. haakeii*, *L. hartskeerlii*, *L. saintgironisae*, *L. neocaledonica*, *L. perolatii*, *L. dzoumogneensis*, *L. fletcheri*, *L. fluminis*, *L. johnsonii*, *L. koniamboensis*, *L. langatensis*, *L. sarikeiensis*, *L. selangorensis*, *L. semungkisensis*, *L. andrefontaineae*, *L. inadai* (Picardeau M., 2020).

Las especies saprófitas se dividen en subclados S1 y S2.

En el subclado S1 se encuentran: *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. yanagawae*, *L. brenneri*, *L. harrisiae*, *L. levettii*, *L. kemamanensis*, *L. bandrabouensis*, *L. bourretii*, *L. bouyouniensis*, *L. congkakensis*, *L. ellinghausenii*, *L. jelokensis*, *L. kanakyensis*, *L. montravelensis*, *L. mtsangambouensis*, *L. noumeaensis*, *L. perdikensis*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. idonii* (Picardeau M., 2020).

Mientras que en el subclado S2 se encuentran: *L. ilyithenensis*, *L. kobayashii*, *L. oignonii*, *L. ryugenii* (Picardeau M., 2020).

4.4 Patogenia

La transmisión de leptospirosis a los humanos generalmente ocurre a través del contacto con suelos o aguas contaminadas con la orina de animales infectados siendo estos en su mayoría reservorios como las ratas las cuales son portadores asintomáticos de los patógenos (Picardeau M., 2020) (Figura 1). Hay diversos factores que propician la infección y establecimiento de la misma los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la gravedad de la enfermedad como lo son las características de virulencia de la cepa infectante, el tamaño del inóculo infectante durante la exposición ambiental y los factores de susceptibilidad del huésped (Picardeau M., 2020).

Leptospira puede ingresar al organismo a través de heridas cutáneas, de membranas mucosas expuestas, conjuntiva y la perteneciente a bucofaringe y nasofaringe (Chacon P., 2015).

Una vez dentro del organismo, se produce una fase de leptospiremia en la cual las bacterias circulan en la sangre y se replican en diversos tejidos, en los que se incluye el hígado, los riñones, los pulmones, el tracto genital y el SNC durante 7 a 10 días,

pudiéndose aislar a partir de sangre como de líquido cefalorraquídeo (LCR) durante los primeros cuatro a diez días de cursar con la enfermedad (Chacon P., 2015).

Pueden llevar a cabo la lesión de los vasos sanguíneos pequeños, dando lugar a una vasculitis, ocasionando la salida de elementos celulares e intravasculares como eritrocitos, siendo la vasculitis la responsable de las manifestaciones más importantes de la enfermedad, puesto que, en los casos más graves, la vasculitis provoca alteraciones en la microcirculación y un aumento en la permeabilidad, lo que resulta en pérdida de líquidos y en hipovolemia (Chacon P., 2015).

Los órganos que principalmente se ven afectados son los riñones y el hígado, sin embargo, pueden causar una lesión en cualquier órgano, por ejemplo, en el riñón *Leptospira* migra al intersticio, túbulos renales y luz tubular, originando nefritis intersticial y necrosis tubular, además, al presentarse una hipovolemia por deshidratación y la permeabilidad capilar, se favorece una insuficiencia renal (Chacon P., 2015). Mientras que en el hígado puede presentarse necrosis centrolubulillar con la proliferación de células de Kupffer (Chacon P., 2015). La lesión pulmonar es producida a consecuencia de la hemorragia presentada, no de la inflamación (Chacon P., 2015). Así mismo, cuando *Leptospira* invade el tejido muscular estriado, genera tumefacción, degeneración vacuolar de las miofibrillas y necrosis focal (Chacon P., 2015).

Cuando en el organismo se generan anticuerpos antileptospira, las bacterias son eliminadas de la mayoría de regiones del organismo del hospedador, exceptuando al ojo, tubulos proximales renales y probablemente el cerebro, donde puede persistir durante semanas o meses (Chacon P., 2015). La persistencia de *Leptospira* en humor acuoso, puede ocasionar, en algunos casos, uveítis crónica o recurrente (Chacon P., 2015).

Leptospira permanece en los túbulos de los riñones de los huéspedes incidentales durante un breve período de tiempo y se excretan en la orina durante unos días o varias semanas (Chacon P., 2015). Sin embargo, en los huéspedes de mantenimiento a menudo permanecen en los túbulos renales, el tracto genital y, con menos frecuencia, en los ojos, a pesar de la presencia de niveles elevados de anticuerpos séricos (Chacon, P., 2015). Los animales persistentemente infectados eliminan *Leptospira* a través de la orina y secreciones genitales durante meses o incluso años, estos animales se convierten en un importante reservorio de infección, con la capacidad de transmitir la infección tanto a otros reservorios como a huéspedes incidentales quienes podrían desarrollar la enfermedad (Chacon, P., 2015).

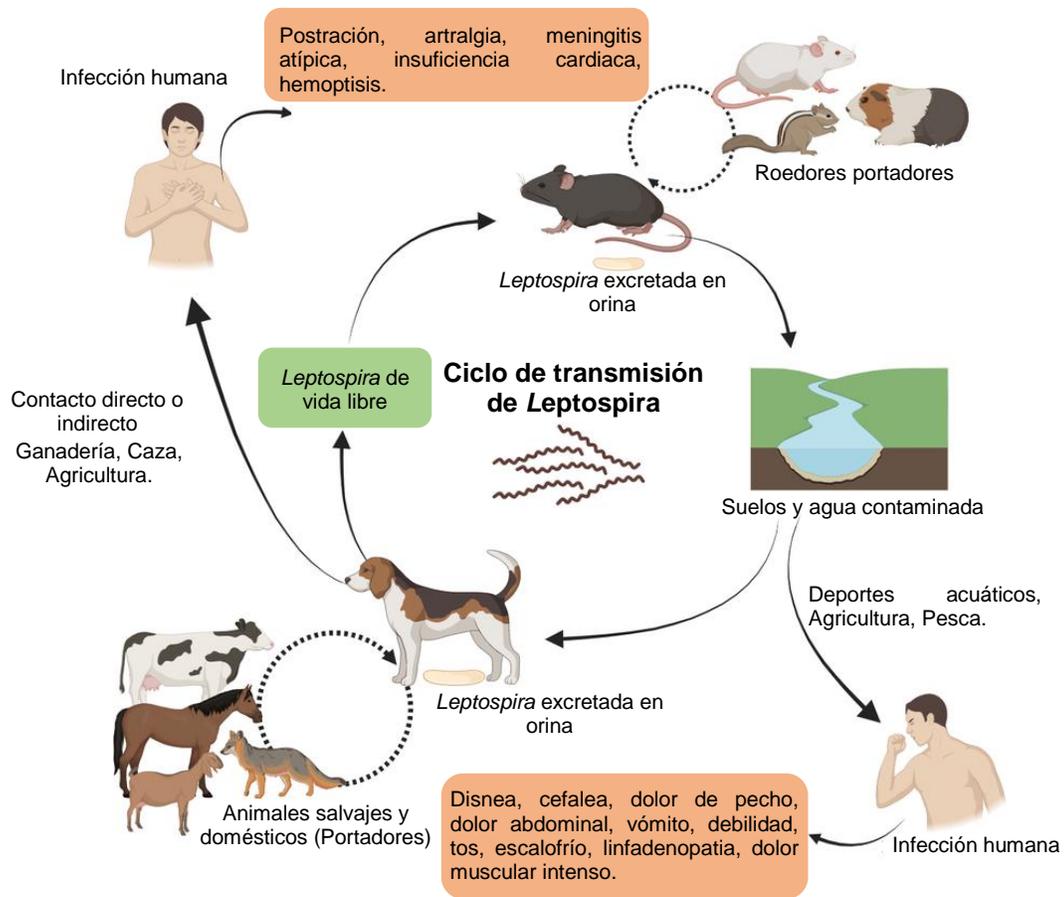


Figura 1. Ciclo de transmisión de *Leptospira*. *Leptospira* ingresa al organismo a través de mucosa y heridas en la piel, por el contacto con suelos o agua contaminados con la orina de animales domésticos o salvajes portadores de la bacteria (Akhtar, T *et. al*, 2023).

4.5 Manifestaciones clínicas

Al cursar con leptospirosis se pueden presentar diversas manifestaciones clínicas, pudiendo variar desde una enfermedad febril aguda leve y autolimitada hasta una afección grave y potencialmente mortal debido a falla multiorgánica (Rajapakse S., 2022).

Las manifestaciones clínicas comúnmente presentadas son similares a las que se observan en muchas enfermedades febriles, como el dengue, infecciones por rickettsiosis, paludismo y sepsis bacteriana, entre otras enfermedades que se presentan en los trópicos (Rajapakse S., 2022).

La mayoría de individuos infectados presentan fiebre sin alguna otra complicación y aproximadamente el 10% desarrolla una enfermedad grave, presentando sufusión conjuntival, ictericia y lesión renal aguda conocido como síndrome de Weil (Rajapakse S., 2022). Aunado al hecho que recientemente se ha identificado la hemorragia pulmonar como una de las principales causas de mortalidad (Rajapakse S. 2022).

El periodo de incubación requerido presenta una amplia variación, de entre 2 y 20 días, generalmente de 7 a 12 días (Raul B. *et al.*, 2019).

La enfermedad febril comienza con síntomas generales e inespecíficos, como cefalea, escalofríos, vómitos, mialgias intensas y conjuntivitis, los cuales pueden durar entre 5 y 10 días. Posteriormente, la enfermedad puede presentarse en dos formas, al ser ésta de naturaleza bifásica. La forma más común es la anictérica, en la que se desarrolla una fase leptospirémica caracterizada por fiebre elevada de 39 a 40 °C, cefalea frontal o retroorbitaria, fotofobia, mialgias espontáneas o provocadas, artralgias, escalofríos, anorexia y síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos o diarrea, además de

síntomas respiratorios (Raul B. *et al.*, 2019). La segunda fase corresponde a la forma icterica, que puede generar complicaciones graves e incluso ser fatal. Esta forma se caracteriza por ictericia, insuficiencia renal aguda, hemorragias, anemia, miocarditis, hepatomegalia y esplenomegalia, con menor frecuencia pancreatitis. Sin un tratamiento adecuado, la enfermedad puede progresar hacia una etapa crítica, manifestándose con pericarditis, rabdomiólisis, hemólisis, coagulación intravascular diseminada, shock séptico y falla multiorgánica (Raul B. *et al.*, 2019).

4.6 Epidemiología

Leptospirosis es una zoonosis bacteriana con amplia distribución a nivel mundial (Raul B. *et al.*, 2019). Aunque su incidencia se reconoce cada vez más en los países desarrollados, la mayoría de casos presentados se encuentra en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, tanto en entornos urbanos como rurales (Raul B. *et al.*, 2019).

Se considera a leptospirosis como una antropozoonosis, debido a que afecta tanto a los humanos como a diferentes tipos de animales, incluyendo mamíferos domésticos, animales salvajes y especies de sangre fría (Raul B. *et al.*, 2019).

Casi todos los mamíferos pueden servir como portadores de leptospirosis, albergando y eliminando los organismos de los túbulos proximales de los riñones (Rajapakse S., 2022).

Los roedores son los principales animales que fungen como reservorio de *Leptospira*, esto debido a la presencia ubicua de las ratas en entornos cercanos a humanos, donde excretan concentraciones elevadas de *Leptospira* en la orina, inclusive

después de un tiempo prolongado posterior a la infección inicial, siendo estos meses o incluso años (Rajapakse S., 2022). Cabe destacar que otros mamíferos también pueden contribuir significativamente a las infecciones humanas en algunos entornos (Rajapakse S., 2022).

Las condiciones que permiten la supervivencia ambiental de las especies patógenas del género *Leptospira* determinan en gran medida la distribución de la enfermedad, sin embargo, el comportamiento humano también juega un papel en la exposición directa e indirecta (Goarant C., 2016). Los seres humanos son huéspedes incidentales y se infectan cuando entran en contacto con estas bacterias, a través del contacto directo de lesiones cutáneas o membranas mucosas con la orina de un animal portador o, en la mayoría de los casos, a través del contacto con cuerpos de agua dulce o suelo contaminado con orina (Goarant C., 2016).

El número de casos de *Leptospirosis* presentados a nivel mundial, pone en manifiesto las brechas en la prevención de la enfermedad, así como en su control (Raul B. *et al.*, 2019). *Leptospirosis* es una enfermedad reemergente a nivel mundial, con una amplia diversidad de especies y un alto riesgo de infección, por lo cual se clasifica dentro de las primeras 35 causas de muerte a nivel mundial, representando un problema en salud pública, ya que, de no controlarse puede conllevar a mortalidades humanas y animales significativas, así como pérdidas económicas elevadas (Raul B. *et al.*, 2019).

4.6.1 Epidemiología mundial

Leptospirosis está presente en todos los continentes, obteniéndose reportes en África, Alemania, América Latina y el Caribe, Austria, Bulgaria, Canadá, China, Croacia, España, Estados Unidos, Filipinas, Finlandia, Francia, Grecia, Hawái, Hungría, Indonesia,

Italia, Israel, Japón, Malasia, México, Noruega, Nueva Zelanda, Países Bajos, Polonia, Portugal, Suecia, Tailandia, entre otros países por lo que presumiblemente es la zoonosis más distribuida a nivel mundial (Torres *et al.*, 2016). Su incidencia es más significativa en poblaciones rurales de climas tropicales y subtropicales y en zonas inundables, presentándose picos en los meses de junio a noviembre (Torres *et al.*, 2016) (Figura 2). Existen diversos estudios los cuales concuerdan que la leptospirosis representa del 20 al 40% del total de enfermedades febriles de origen desconocido que afectan a seres humanos (Torres *et al.*, 2016). Así mismo, se atribuye a leptospirosis como responsable aproximadamente del 10% de admisiones hospitalarias en países endémicos (Torres *et al.*, 2016).

4.6.2 Epidemiología en México

Leptospirosis es una zoonosis endémica en zonas tropicales y subtropicales de México (Torres *et al.*, 2020). La incidencia y prevalencia de la leptospirosis varían según la región, dependiendo de factores socioeconómicos como las condiciones de higiene y saneamiento, así como de factores ecológicos como la humedad, temperatura, precipitaciones e inundaciones, los cuales favorecen la dispersión y supervivencia de *Leptospira* en el ambiente (Torres *et al.*, 2020). En la figura número 3, podemos apreciar los estados de México en los cuales se reportaron casos de *Leptospirosis* de acuerdo al boletín epidemiológico de la semana 52 del año 2023.

4.6.3 Epidemiología en Sinaloa

De acuerdo con los reportes publicados en el boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en México, durante la semana epidemiológica

número 52 del año 2023, se reportaron un total de 285 casos, siendo Sinaloa el estado con mayor incidencia, donde se reportaron un total de 83 casos.

En Sinaloa de acuerdo al boletín epidemiológico de la semana 52 del año 2023 fueron reportados por la secretaria de salud un total de 83 casos de leptospirosis, siendo Culiacán el municipio con mayor número de casos, reportándose un total de 32 casos, seguido por Ahome con 24 casos, Mazatlán con 12, Escuinapa con 7, Guasave con 6 y Salvador Alvarado con 2 (Figura 4).

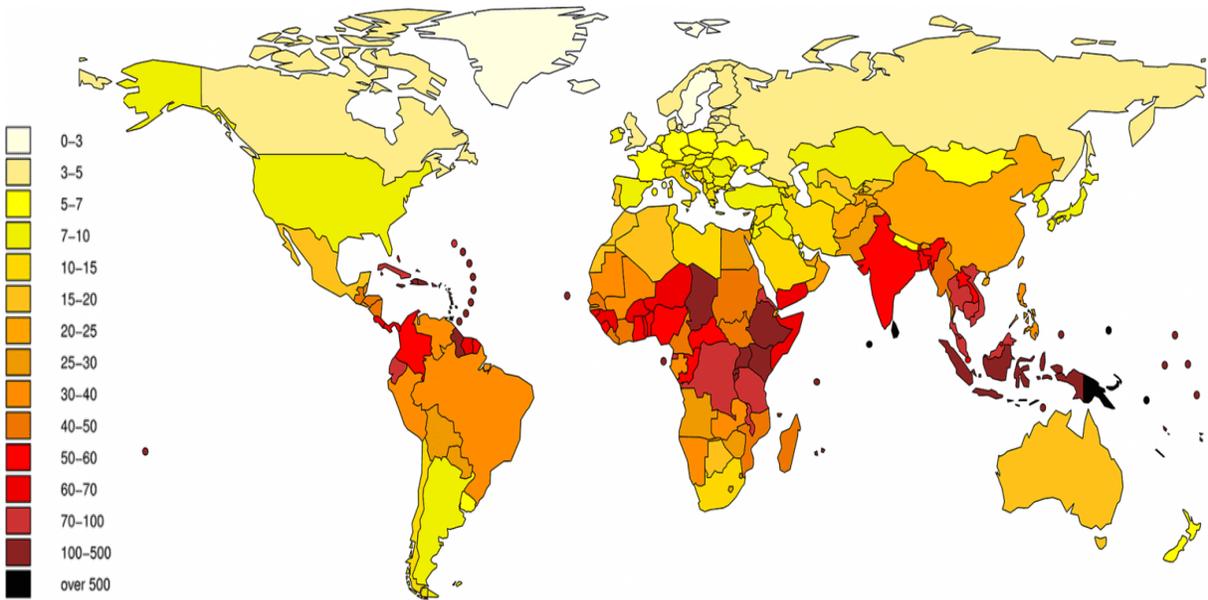


Figura 2. Leptospirosis a nivel mundial. Casos de leptospirosis por cada 100,000 habitantes. Los colores representan diferentes rangos de casos, siendo los tonos más claros indicativos de una incidencia baja (0-3 casos) y los tonos más oscuros de una incidencia alta (más de 500 casos), entre los países con mayor número de casos reportados se encuentran, Tailandia, Indonesia, India y Sri Lanka. En América, los países en el los cuales se reporta un mayor número de casos, son Brasil, Colombia, Nicaragua, Guyana República dominicana y Puerto Rico (Browne, *et al.*, 2023).

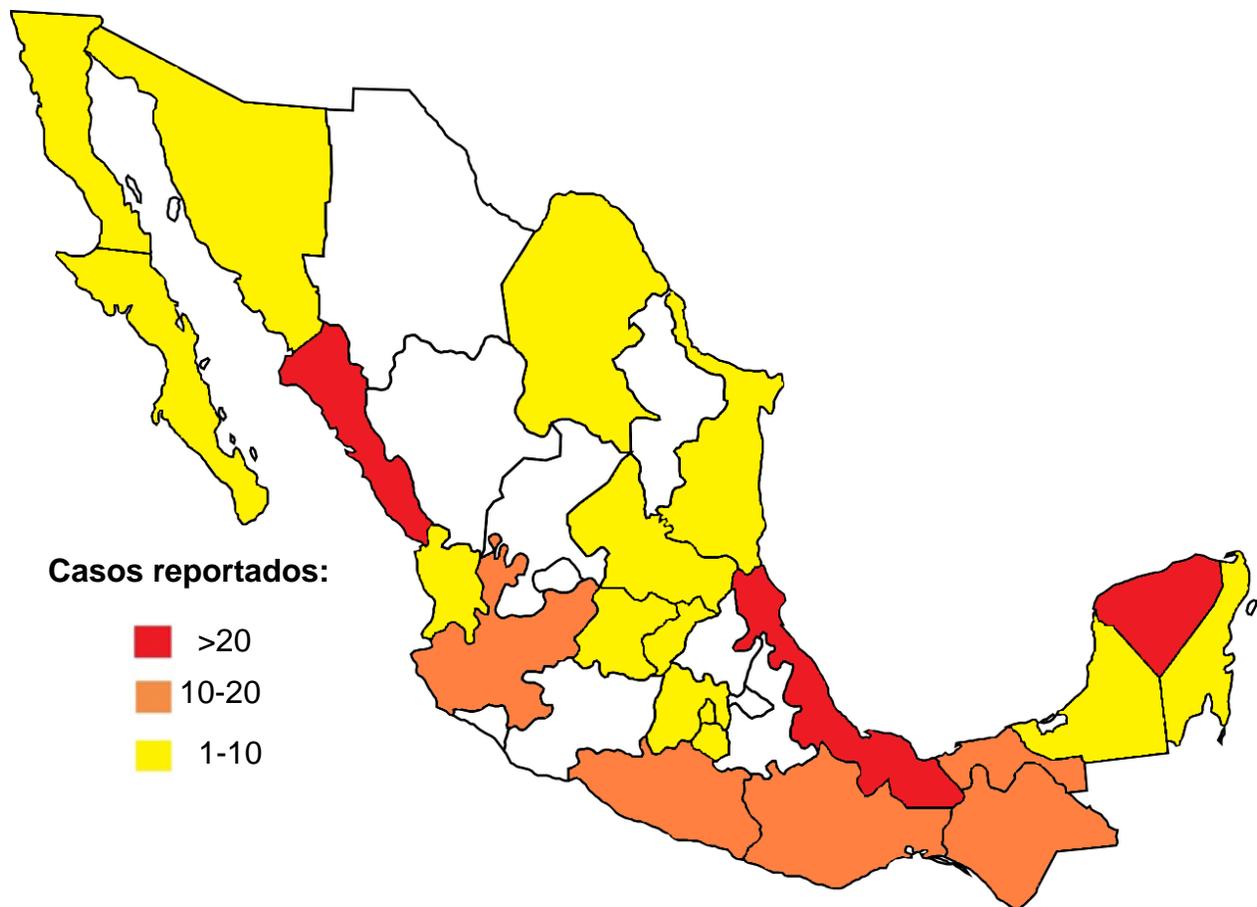


Figura 3. Epidemiología de leptospirosis en México. En rojo se muestran los estados con mayor incidencia de *Leptospira* hasta la semana epidemiológica número 52 del año 2023 (Sinaloa: 83 casos, Veracruz: 43 y Yucatán: 33), en naranja los estados con incidencia intermedia (Jalisco: 20, Chiapas: 19, Guerrero: 19, Tabasco: 18, Oaxaca: 13) y en amarillo los estados con menor incidencia (México: 8, Ciudad de México: 6, Quintana Roo: 7, Sonora: 5, Morelos: 2, Baja California: 1, Campeche: 1, Coahuila: 1, Guanajuato 1:, Nayarit: 1, Querétaro: 1, San Luis Potosí: 1, Tamaulipas: 1).



Figura 4. Casos de leptospirosis en Sinaloa en el año 2023. En rojo se muestran los municipios de Sinaloa que presentaron casos de leptospirosis, de acuerdo con el boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud de Sinaloa, de la semana 52 en el año 2023; ocupando el primer lugar Culiacán con 32 casos, seguido por Ahome con 24 casos, Mazatlán con 12, Escuinapa con 7, Guasave con 6 y Salvador Alvarado con 2.

4.7 Tratamiento

La mayoría de los casos de leptospirosis son leves y se resuelven con autoinmunidad (Hsu y Yang, 2022). El uso temprano de antibióticos puede prevenir aún más que la leptospirosis progrese a una enfermedad grave (Hsu y Yang, 2022). Por lo tanto, los antibióticos se pueden iniciar una vez que se sospecha de leptospirosis después de un historial y un examen (Hsu y Yang, 2022). Los antibióticos como la doxiciclina, la azitromicina, la ampicilina y la amoxicilina se usan para el tratamiento de la leptospirosis leve (Hsu y Yang, 2022). Para la leptospirosis grave, se recomienda penicilina intravenosa (IV) (Hsu y Yang, 2022). Además, la amoxicilina, la ampicilina y la ceftriaxona también se pueden usar en casos graves (Hsu y Yang, 2022).

Es indispensable tener en cuenta que el tratamiento dependerá de factores determinantes como la edad, el nivel de gravedad del estado de salud del paciente, los antibióticos que se utilizarán en el tratamiento, entre otros factores (Joya *et al.*, 2015). Es por ello que se debe tener conocimiento de la historia clínica del paciente para así proveer un tratamiento efectivo y eficiente (Joya *et al.*, 2015).

Las personas con riesgo ocupacional como los agricultores, los trabajadores agrícolas, los deportistas que estén en contacto con agua dulce y las personas que se involucren en inundaciones pueden recibir orientación para que usen el equipo de protección adecuado, como guantes, botas, etc., para evitar el contacto con el agente infeccioso (Karpagam y Ganesh, 2020).

4.8 Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis es realizado en mayor proporción al presentar características que sugieran la presencia de la enfermedad, con antecedentes de riesgo a la exposición a la bacteria, sospechando de leptospirosis en pacientes con antecedentes de exposición y presenten cualquiera de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, mialgia, postración, ictericia, sufusión conjuntival, oliguria, irritación meníngea, hemorragia, insuficiencia cardíaca o arritmia, tos, disnea, erupción cutánea o evidencia de compromiso o disfunción de órganos (Rajapakse S., 2022). Debido a las características clínicas de la leptospirosis comúnmente es confundida con otras enfermedades de tipo febril, lo cual dificulta un diagnóstico oportuno (Rajapakse S., 2022).

El diagnóstico diferencial de la leptospirosis debe considerar principalmente enfermedades endémicas de la región que presenten síntomas clínicos semejantes, tales como influenza, dengue, infecciones por hantavirus (incluyendo el síndrome pulmonar por hantavirus) y otros trastornos respiratorios, rickettsiosis, borreliosis, meningitis aséptica, fiebre tifoidea, otras fiebres entéricas y hepatitis virales (Pérez *et al.*, 2015)

Existe diversas pruebas para el diagnóstico de leptospirosis; sin embargo, la disponibilidad de dichas pruebas en entornos de escasos recursos se ve limitada (Rajapakse S., 2022). Además, la precisión de las pruebas es variable (Rajapakse S., 2022).

En términos generales, las pruebas para el diagnóstico de leptospirosis se dividen en aquellas que brindan evidencia directa de infección (demostración de *Leptospira* o su

ADN) y pruebas que brindan evidencia indirecta de infección (demostración de anticuerpos contra la leptospirosis) (Rajapakse S., 2022).

El diagnóstico de *Leptospira* es complicado debido a varias razones, como, por ejemplo, no todas las áreas endémicas cuentan con laboratorios adecuados y personal de laboratorio capacitado (Karpagam y Ganesh, 2020). También se debe a que no se dispone de una técnica de prueba estándar para comprobar la infección en todas las etapas (Karpagam y Ganesh, 2020).

Debido a la diversidad de serovares capaces de infectar a un organismo, se utilizan métodos de diagnóstico altamente específicos, como la detección de anticuerpos fluorescentes, el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microaglutinación con antígenos vivos (MAT) (Raul B. *et al.*, 2019). Para confirmar la enfermedad, es necesario obtener muestras de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo (Raul B. *et al.*, 2019).

4.8.1 Microscopía de campo oscuro

La microscopía directa y la microscopía de contraste de fase de campo oscuro son técnicas para la identificación de *Leptospira* en fluidos como sangre, orina y LCR, visualizándose la apariencia morfológica de esta y su motilidad (Verma *et al.*, 2020). Sin embargo, la desventaja de este método radica en que la cantidad mínima de *Leptospira* a visualizar es de aproximadamente 10 células/ml y el resultado positivo se reduce al 90% si la infección supera la semana (Verma *et al.*, 2020). Además, se puede presentar falsos positivos o falsos negativos al utilizar este método de diagnóstico, por lo cual la sensibilidad es baja, (Verma *et al.*, 2020). Adicionalmente, mediante esta metodología es imposible detectar la especie bacteriana.

4.8.2 Cultivo

Una de las principales pruebas para el diagnóstico de leptospirosis es el aislamiento de la bacteria a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo o fluidos corporales durante los primeros 10 días de cursar con la enfermedad, mientras que a partir de la segunda semana de cursar con la enfermedad se puede cultivar a partir de muestras de orina (Verma *et al.*, 2020). Se requiere medios de cultivo especiales enriquecidos con suero de conejo al 8-10 % v/v suplementado con rifampicina, neomicina y actidona, Tween-80, albúmina bovina y vitaminas del complejo B (Verma *et al.*, 2020). Entre estos los más reconocidos son los medios Fletcher, Korthoff y Ellinghausen- McCullough- Johnson- Harris (EMJH), visualizando el crecimiento de las *Leptospiras* mediante microscopía de campo oscuro y medirse en términos de CFU/mL (Verma *et al.*, 2020).

Los medios semisólidos inoculados con *Leptospira* deben incubarse durante seis a trece semanas en la oscuridad, entre 28 °C y 30 °C y examinarse periódicamente mediante microscopía de campo oscuro (Soo *et al.*, 2020).

El crecimiento de la bacteria en medios de cultivo es lento, tomando hasta cuatro meses, propiciando que en este tiempo puede presentarse una contaminación por crecimiento de otras bacterias (Pérez *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2016).

4.8.3 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la leptospirosis y pueden detectar esta enfermedad después del sexto del inicio de la enfermedad, detectando anticuerpos séricos (Verma *et al.*, 2020). Dentro de estas pruebas se encuentra el ensayo de aglutinación microscópica (estándar de oro), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Verma *et al.*, 2020).

4.8.3.1 Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

La prueba serológica de Microaglutinación (MAT) evalúa los anticuerpos formados en la sangre de los pacientes sospechosos a presentar la infección por la interacción presentada con los antígenos antileptospira vivos (Verma *et al.*, 2020). En esta prueba, se realiza la interacción del cultivo de *Leptospira* de 7 a 12 días con los anticuerpos del suero de los pacientes en las placas con pocillos, evaluando la interacción antígeno-anticuerpo presentada al medir la aglutinación mediante un microscopio de campo oscuro y posteriormente determinando el título de la muestra (Verma *et al.*, 2020).

Se considera el estándar de oro para el diagnóstico serológico de la leptospirosis en humanos y animales, ya que es un ensayo sensible, pero dado que las especies de *Leptospira* poseen heterogeneidad antigénica, se requiere una gran cantidad de serovariedades para ser consideradas como antígenos (Verma *et al.*, 2020). Por lo tanto, esta prueba no es útil en la etapa temprana del diagnóstico de la enfermedad, ya sea por la falta de anticuerpos específicos en el sistema inmunitario o el título Ab es muy bajo, lo que conduce a resultados falsos negativos (Verma *et al.*, 2020).

Aunque es una prueba específica, su sensibilidad depende de los días de evolución de la enfermedad, siendo menor en la fase aguda (primera semana), por lo tanto, no es útil en la etapa temprana del diagnóstico de la enfermedad, ya sea por la falta de anticuerpos específicos en el sistema inmunitario o el título de anticuerpos es muy bajos, lo que ocasiona el reporte de falsos negativos (Scialfa *et al.*, 2020; Verma *et al.*, 2020).

En el municipio de Culiacán Sinaloa, Ramírez y colaboradores en el año 2020 analizaron 247 muestras de suero de donadores de sangre de hospitales públicos mediante microaglutinación para la identificación de serovariedades de *Leptospira* presentes en las muestras, obteniendo 8 muestras seropositivas representando 3.23% de positividad (Hernández R., *et al.*, 2020).

4.8.3.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

ELISA detecta anticuerpos IgM que aparecen en la sangre, a diferencia de MAT esta técnica no requiere el uso de antígenos vivos para el diagnóstico (Verma *et al.*, 2020). Sin embargo, esta forma de diagnóstico es discreta ya que la prueba de suero único para pacientes sospechosos no es suficiente para la confirmación de la enfermedad y requiere una prueba de confirmación analizando sueros de pacientes sospechosos también después de dos semanas (Verma *et al.*, 2020). Otra limitación para el uso de este método diagnóstico es el tiempo requerido para la formación de anticuerpos IgM, su aparición y límite de detección en el suero (Verma *et al.*, 2020). Además, el límite de persistencia de los anticuerpos IgM en el suero es muy largo, por lo que la probabilidad de aparición de falsos positivos y falsos negativos es mayor (Verma *et al.*, 2020).

El ensayo se basa en la detección de anticuerpos IgM; como los anticuerpos IgM aparecen en niveles bajos durante la primera semana de la enfermedad, la confirmación

del diagnóstico mediante IgM-ELISA es más precisa después de la segunda semana, durante la fase de convalecencia (Soo *et al.*, 2020). Sin embargo, todavía es altamente confiable para ser realizado durante la fase aguda para un diagnóstico temprano (Soo *et al.*, 2020).

Los anticuerpos IgM en la leptospirosis persisten durante mucho tiempo, las tasas de disminución varían y las concentraciones de bacterias en suero son más bajas que en la sangre fresca, por lo que ELISA puede ser aplicada como prueba rápida para diagnóstico de leptospirosis, esta prueba ha demostrado una mayor sensibilidad que la MAT en fases tempranas de la enfermedad, obteniéndose resultados positivos antes que esta, demostrando también ser más eficaz que otros métodos serológicos utilizados (Joya *et al.*, 2015; Ospina *et al.*, 2015).

4.8.4 Diagnóstico molecular

La necesidad de un método por el cual se pueda obtener un resultado rápido y que a su vez sea sensible y específico para el diagnóstico de leptospirosis, ha llevado a la implementación de pruebas moleculares para la detección de *Leptospira* a partir de muestras clínicas o ambientales (Karpagam y Ganesh, 2020; Soo *et al.*, 2020).

La principal ventaja de implementar estas técnicas, radica en su capacidad de detectar pequeñas cantidades de material genético, incluso menos de 10 *Leptospiras*, lo que permite identificar la presencia de la bacteria antes de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas convencionales (Verma *et al.*, 2020).

Un diagnóstico rápido y directo es posible mediante la implementación de diversas pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa y sus

variantes (PCR anidada y PCR/RFLP) en muestras biológicas como sangre, suero, orina, humor acuoso, líquido cefalorraquídeo y diversos tejidos como riñón e hígado, en etapas tempranas como de recuperación de la infección (Karpagam y Ganesh, 2020).

Las pruebas basadas en PCR son dirigidas a genes presentes en *Leptospira*, como *rrs* (gen 16S rRNA) y *secY*; y proteínas de superficie restringidas a *Leptospira*, como *lipL21*, *lipL32*, *lipL41* y *ligB* (Azevedo *et al.*, 2021).

De acuerdo a la literatura el primer marcador genético aplicado para la identificación de *Leptospira* fue el gen 16S rRNA, utilizados durante mucho tiempo como objetivo de ensayos basados en PCR para diagnóstico, debido a que tiene la capacidad de ayudar a diferenciar entre especies patógenas, intermedias y saprófitas, siendo útil solo para un cribado inicial, puesto que presenta baja resolución taxonómica para diferenciar entre especies de *Leptospira* dentro de un clado, es por ello que se requiere de otra metodología para realizar la identificación de las especies causantes de la enfermedad (Azevedo *et al.*, 2021).

El gen *lipL32* codifica una lipoproteína de membrana externa, el cual se encuentra altamente conservado entre las especies patógenas de *Leptospira*, siendo este considerado un factor de virulencia, el cual nos permite una identificación selectiva de *Leptospira* patógena (Podgoršek *et al.*, 2020). Actualmente en nuestro grupo de investigación se realizó un trabajo donde se utilizó el gen *lipL32* de especies patógenas para el diagnóstico de la enfermedad activa, ya que es posible identificar genoma de la bacteria en la muestra (Lagarde Guerrero, 2024).

El gen *secY* es un gen de mantenimiento de *Leptospira* ubicado en el cromosoma CI que codifica una preproteína translocasa importante para la exportación de proteínas

a través de la membrana citoplasmática y ha sido el más utilizado, entre los genes menos conservados (Azevedo *et al.*, 2021). Presenta un buen poder discriminatorio y el análisis de secuencia del gen permite la identificación de especies, cepas y, en ocasiones, genotipos de *Leptospira* (Azevedo *et al.*, 2021). En este contexto, actualmente se usa más en un segundo paso con fines discriminatorios y taxonómicos, proporcionando información epidemiológica importante (Azevedo *et al.*, 2021).

Se han realizado diversos estudios a nivel mundial con la finalidad de detectar a *Leptospira* en muestras biológicas, tal es el caso de Philip N. y colaboradores quienes en el año 2020, en Malasia, analizaron 165 muestras de sangre mediante PCR dirigida al gen *lipL32*, de pacientes con enfermedad febril aguda con síntomas como dolor de cabeza, mialgia, artralgia, irritación meníngea, ictericia, sufusión conjuntival, erupción cutánea, anuria u oliguria, arritmia o insuficiencia cardíaca, hemorragias en intestinos o pulmones y síntomas gastrointestinales, obteniendo como resultado 47/165 muestras positivas, con una frecuencia de positividad del 29% (Philip N., *et al.*, 2020).

Daša Podgoršek y colaboradores en el año 2020 analizaron mediante ensayos de PCR dirigidos al gen *lipL32*, 400 muestras de 310 pacientes eslovenos con manifestaciones clínicas sugestivas de leptospirosis, de las cuales 234 fueron muestras de sangre y 166 de orina, obteniendo como resultado 31/234 muestras de sangre positivas y 16/166 muestras de orina positivas, con una positividad del 13.2% en sangre y del 9.6% en orina (Podgoršek D., *et al.*, 2020).

Así mismo, en Culiacán Sinaloa, Lagarde en el presente año 2024, detectó la presencia de *Leptospira* en muestras de sangre de pacientes con fiebre de origen desconocido, mediante qPCR, utilizando como diana un fragmento del gen *lipL32* del

genoma de la bacteria, identificando la presencia de la bacteria en 20 de las 109 muestras de sangre analizadas, obteniendo una frecuencia de positividad del 18.35% (Lagarde Guerrero, 2024)

V. JUSTIFICACIÓN

Debido a que Sinaloa es uno de los estados de México en el cual se reporta un mayor número de casos de leptospirosis, además de una elevada tasa de mortalidad asociada a esta enfermedad, en la cual las manifestaciones clínicas presentan una amplia variación, desde fiebre, cefalea, mialgia, fotofobia, sintomatologías presentadas en enfermedades endémicas de la región, hasta un cuadro febril icterohemorrágico grave con falla multiorgánica, pudiendo conllevar a la muerte de la persona infectada. Es de suma importancia el establecer una metodología rápida que nos permita realizar un correcto diagnóstico diferencial de leptospirosis, donde sea posible identificar la especie de *Leptospira*.

VI. HIPÓTESIS

Se identificará al menos una especie distinta a *L. interrogans* en muestras de sangre y orina de seres humanos en Culiacán Sinaloa.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia y especies de *Leptospira* presentes en muestras de sangre y orina de seres humanos con sintomatología compatible con leptospirosis en Culiacán Sinaloa.

7.2 Objetivos Específicos

1. Identificar *Leptospira* en muestras de sangre y orina de seres humanos.
2. Determinar la especie de *Leptospira* presente en las muestras positivas.
3. Relacionar las variables analizadas con la presencia de la infección.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Microscopía de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), con dirección, Av. De las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán Sinaloa, México, C.P. 80010, bajo la supervisión del Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado y el Dr. Rogelio Lagarde Guerrero.

8.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal, en el cual se analizó muestras de sangre y orina de pacientes que acudieron a las instalaciones del Hospital Regional del ISSSTE Dr. Manuel Cárdenas de la Vega, los cuales presentaban una sintomatología compatible con leptospirosis, en un periodo comprendido entre los meses de julio y diciembre del año 2023, los cuales firmaron una carta de consentimiento informado y a su vez, se les realizó una encuesta epidemiológica, mediante la cual se obtuvieron datos de los pacientes tales como edad, sexo, manifestaciones clínicas.

8.2 Recolección de muestra

Las muestras de sangre se recolectaron mediante punción venosa, obteniendo un volumen final de 3 ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA, así mismo, se recolectaron 15 ml de orina de cada paciente en tubo falcon. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Microscopía para su posterior procesamiento.

8.3 Metodología

8.3.1 Método de extracción de ADN

Muestra de sangre

En un tubo falcon de 15 ml se agregó 3 ml de sangre total, y se aforó hasta 13 ml con solución de lisis de eritrocitos, para posteriormente mezclarse por inversión, seguido de una incubación a 4°C durante 20 minutos, se centrifugó a 4000 rpm/10min y se eliminó el sobrenadante, la pastilla obtenida fue resuspendida en 13 ml de Sol. Salina 0.9% y se centrifugó a 4000 rpm/5min, se eliminó el sobrenadante, para posteriormente resuspender la pastilla en 600 µL de *Buffer* de lisis de núcleos y mezclar por vortex durante 30 segundos, seguido de una incubación a 60°C toda la noche, concluida la incubación se agregó 200 µL de NaCl 5M y se agitó por vortex durante 20 segundos, se centrifugó a 16000g/3min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml con 600 µL de isopropanol frío, mezclando por inversión, pudiéndose observar un precipitado de color blanco, seguido de una centrifugación a 16000g/3min y se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol 70%, agitando por inversión, seguido de una centrifugación a 16000 g/3min y se descartó el sobrenadante, la pastilla se secó a temperatura ambiente aproximadamente 1 hora, se resuspendió en 100 µL TE o menos según la cantidad de ADN observado, se incubó a 68°C durante 1 hora y finalmente se almacenó a una temperatura de -20°C (Velázquez *et al.*, 2014).

Muestra de orina

Se inició con una centrifugación de 15 ml de la muestra de orina en tubo falcon de 15 ml a 4000 rpm/10min, posteriormente se descartó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 600 µL de Buffer de lisis de núcleos, se mezcló por vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 16000g/3min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml con 600 µL de isopropanol frío, mezclando por inversión pudiéndose

observar un precipitado de color blanco, seguido de una centrifugación a 16000g/3min y se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol 70%, agitando por inversión, seguido de una centrifugación a 16000 g/3min y se descartó el sobrenadante, la pastilla se secó a temperatura ambiente aproximadamente 1 hora, se resuspendió en 100 μ L TE, se incubó a 68°C durante 1 hora y finalmente se almacenó a una temperatura de -20°C (Velázquez *et al.*, 2014).

8.3.2 Verificación de integridad del ADN:

Se preparó un gel de agarosa a 0.8% con el número de pocillos necesarios y se colocó en cámara de electroforesis. En cada uno de los pocillos se cargó 10 μ L de muestra, 3 μ L de buffer de carga y 3 μ L de *Gel/Red* respectivamente, para posteriormente realizarse una corrida a 100 Volts durante 1 hora. El resultado fue observado mediante luz UV en un transiluminador.

8.3.3 Control interno con gen constitutivo (β -actina):

Se preparó un buffer de reacción: Colocando en un microtubo 11.5 μ L de H₂O, 5 μ L de Buffer 5x, 1 μ L de dNTPS, 2.5 μ L de MgCl₂ 25 μ M, 0.5 μ L de Primer F 10 μ M: GCA CCA CAC CTT CTA CAA TG, 0.5 μ L de Primer R 10 μ M: TGC TTG CTG ATC CAC ATC TG, y 1 μ L de Taq por cada reacción, de la solución obtenida anteriormente se transfirió 22 μ L a cada uno de los tubos para PCR, se agregó a un tubo para PCR 3 μ L de agua como control negativo, se agregó a un tubo para PCR 3 μ L de ADN genómico humano como control positivo y a los tubos para PCR correspondientes a las muestras se les agregó 3 μ L de cada muestra respectivamente, para un volumen final de 25 μ L (Lagarde R., 2019).

Se llevó los tubos a un termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial: 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización: 95°C por 30 segundos, alineamiento: 56°C por 30 segundos, elongación: 72°C por 1 minuto y una elongación final de 72° C por 5 minutos (Lagarde R., 2019).

Se sometió al producto de PCR a electroforesis, para lo cual se realizó un gel de agarosa al 1.5% con el número de pocillos necesarios, agregando en cada pocillo 3 µL de *GelRed*, 3 µL de buffer de carga y 10 µL de muestra, se observó el resultado colocando el gel en transiluminador de luz UV y se consideraron útiles aquellas muestras en las que se presentó una banda correspondiente a un producto de amplificación de un tamaño de 826 pb y fueron utilizadas para la identificación de *Leptospira* (Lagarde R., 2019).

8.3.4 Identificación de *Leptospira* por la amplificación del gen *lipL32*:

Para la identificación de *Leptospira* se amplificó una región del gen *LipL32*, para ello, se preparó un buffer de reacción: colocando en microtubo 11.5 µL de H₂O, 5 µL de Buffer 5x, 1µL de dNTPS, 2.5 µL de MgCl₂ 25 µM, 0.5 µL de Primer F 10 µM: 5'ACTCTTTGCAAGCATTACCGC3', 0.5 µL de Primer R 10 µM: 5'AGCAGACCAACAGATGCAACG3', y 1 µL de Taq por cada reacción, se colocó 22 µL de la solución anterior a un tubo para PCR, se agregó a un tubo para PCR 3 µL de agua destilada como control negativo, se agregó a un tubo para PCR 3 µL de ADN genómico de *Leptospira interrogans* como control positivo y a los tubos para PCR correspondientes a las muestras se les agregó respectivamente 3 µL de muestra, para un volumen final de 25 µL.

Se colocó los tubos en el termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial: 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización: 95°C

por 30 segundos, alineamiento: 59°C por 45 segundos, elongación: 72°C por 45 segundos y una elongación final de 72° C por 5 minutos (Lagarde R., 2019).

Se sometió al producto de PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con 3 µL de *GelRed*, 3 µL de buffer de carga y 10 µL de muestra, y se observó el resultado colocando el gel en transiluminador de luz UV, considerando como positivas aquellas muestras en las que se presente una banda correspondiente a un producto de amplificación de un tamaño de 660 pb (Lagarde R., 2019).

8.3.5 Identificación de especies patógenas de *Leptospira*:

Para la identificación de especies patógenas de *Leptospira* se realizó una PCR anidada de las muestras positivas para *lipL32* dirigida a una región del gen *secY*, para ello, en la PCR inicial, se preparó un buffer de reacción: colocando en microtubo 32.0 µL de H₂O, 5.0 µL de Buffer 5x, 1µL de dNTPS, 3.0 µL de MgCl₂ 25 µM, 1.0 µL de Primer F 10 µM: 5´ ATGCCGATCATTTTTGCTTC 3´, 1.0 µL de Primer R 10 µM: 5´ CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC 3´ y 2.0 µL de Taq por cada reacción, se colocó 45.0 µL de la solución anterior a un tubo para PCR, se agregó a un tubo para PCR 5.0 µL de agua destilada como control negativo, se agregó a un tubo para PCR 5.0 µL de ADN genómico de *Leptospira interrogans* como control positivo y a los tubos para PCR correspondientes a las muestras se les agregó respectivamente 5.0 µL de muestra, para un volumen final de 50µl (Grillova L. *et al.*, 2020)..

Se colocó los tubos en termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial: 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización: 95°C por 30 segundos, alineamiento: 53°C por 30 segundos, elongación: 72°C por 1 minuto y una elongación final de 72° C por 5 minutos (Grillova L. *et al.*, 2020).

Los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a una segunda PCR, para la cual se preparó un buffer de reacción: colocando en microtubo 32.0 μL de H_2O , 5.0 μL de Buffer 5x, 1 μL de dNTPS, 3.0 μL de MgCl_2 25 μM , 1.0 μL de Primer F 10 μM : 5' CCTCAGACGATTATTCAATGGTTATC 3', 1.0 μL de Primer R 10 μM : 5' AGAAGAGAAGTTCCACCGAATG 3' y 2.0 μL de Taq por cada reacción, se colocó 45.0 μL de la solución anterior a un tubo para PCR, se agregó a un tubo para PCR 5.0 μL de agua como control negativo, se agregó a un tubo para PCR 5.0 μL de muestra en la cual se agregó ADN genómico de *Leptospira interrogans* como control positivo y a los tubos para PCR correspondientes a las muestras se les agregó respectivamente 5.0 μL de muestra, para un volumen final de 50 μL (Grillova L. *et al.*, 2020).

El producto de amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con 3 μL de *GelRed*, 3 μL de buffer de carga y 10 μL de muestra, y se observó el resultado colocando el gel en transiluminador de luz UV, considerando como positivas aquellas muestras en las que se presentó una banda correspondiente a un producto de amplificación de un tamaño de 410 pb (Grillova L. *et al.*, 2020).

El producto de amplificación obtenido de 410 pares posterior a la amplificación del fragmento del gen *secY*, fue purificado mediante el kit Wizard genomic dna purification siguiendo las instrucciones del fabricante, para su posterior secuenciación.

8.3.6 Secuenciación

El producto purificado de 410 pares de bases fue enviado a secuenciar a la empresa Macrogen, Corea, la secuencia obtenida fue editada con ayuda del programa CLC Sequence Viewer 24.0.2 y alineada con secuencias reportadas en el Gene Bank del NCBI, con ayuda del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11) se

realizó una construcción de un árbol filogenético, con un método estadístico de Neighbor-joining mediante el modelo de máxima verosimilitud con un valor de bootstrap de 500 réplicas.

8.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron representados mediante tablas y gráficas con ayuda del programa Excel. También se utilizó el software estadístico SPSS Statistics versión 26 para el análisis de los datos. Haciendo uso de la prueba exacta de Fisher, con un grado de significancia estadística de $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1 Descripción de la población

Se recolectaron muestras de sangre y orina de un total de 70 pacientes que presentaban manifestaciones clínicas compatibles con Leptospirosis, las cuales asistieron a las instalaciones del Hospital Regional del ISSSTE Dr. Manuel Cárdenas de la Vega.

La muestra poblacional estudiada fue conformada por 46 mujeres y 24 hombres, 66% y 34% respectivamente, observándose un predominio del sexo femenino (Figura 5). El rango de edad osciló entre 10 y 72 años (Cuadro 1).

Las manifestaciones clínicas referidas por las personas que conforman el grupo de estudio, presentaron una amplia variación, siendo estas las siguientes: Cefalea 55/70 (78.5%); Mialgia 46/70 (65.7%); Fiebre 19/70 (27.1%); Escalofríos 12/70 (17.1%); Fotofobia 6/70 (8.5%); Mareo 5/70 (7.1%); Erupción cutánea 3/70 (4.2%); Conjuntivitis 2/70 (2.8%) e Ictericia 2/70 (2.8%) (Figura 6).

Se recolectaron un total de 131 muestras de las cuales 70 corresponden a muestras de sangre y 61 a muestras de orina (Figura 7).

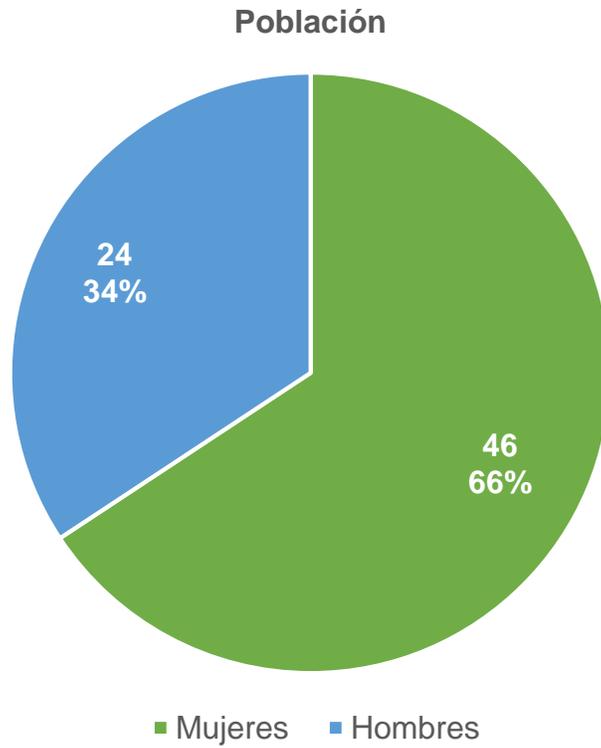


Figura 5. Distribución poblacional por sexo. De las muestras de sangre y orina recolectadas de un total de 70 personas, 24 pertenecen a hombres y 46 a mujeres, representados en color azul y verde respectivamente.

Cuadro 1. Edad poblacional.

	Población	Hombres	Mujeres
Rango de edad (Años)	10 - 72	10 - 71	14 - 72
Media (Años)	40.5	39.2	41.2

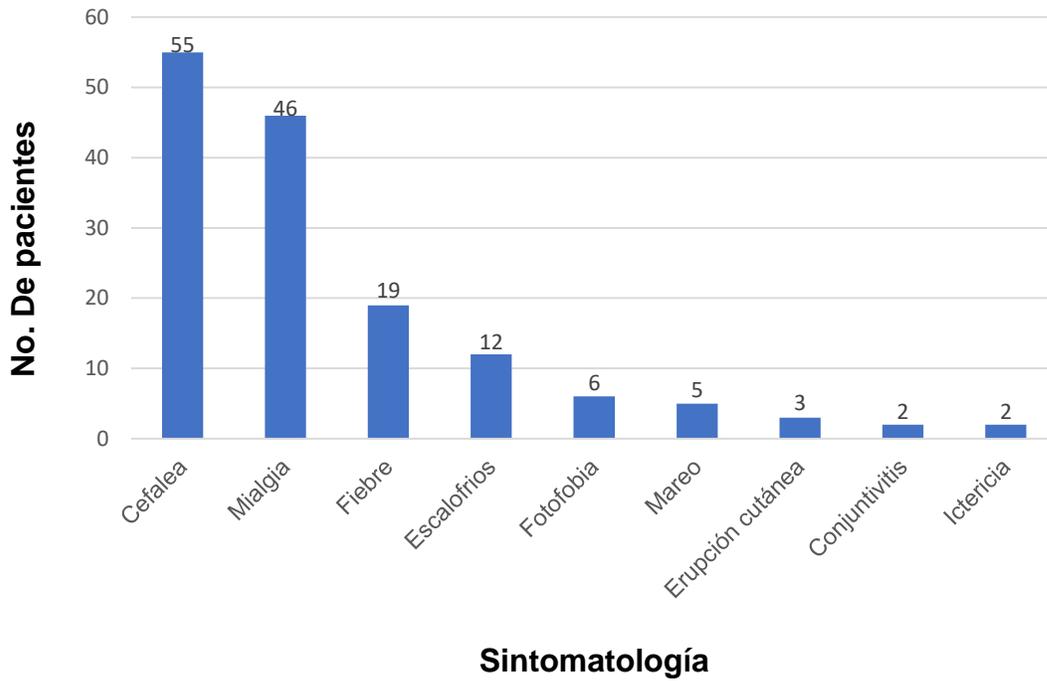


Figura 6. Manifestaciones clínicas. En la presente figura se presenta las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes que conformaron el grupo de estudio, donde la sintomatología más frecuente fue cefalea, seguida de mialgia y fiebre.

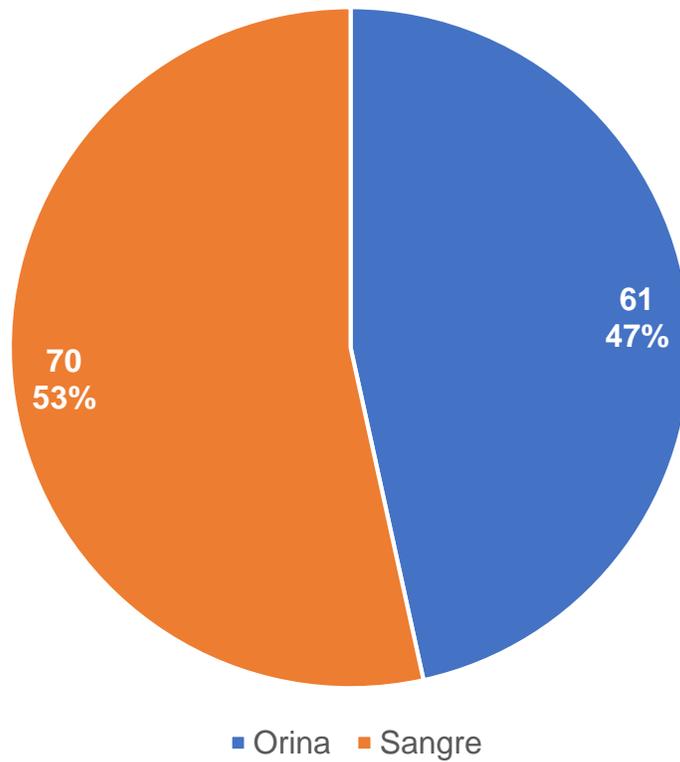


Figura 7. Muestras biológicas. Se recolectaron un total de 131 muestras correspondientes a 70 muestras de sangre (naranja) y 61 muestras de orina (azul).

9.2 Extracción de material genético y verificación de integridad

Se procesaron un total de 131 muestras y se obtuvo ADN integro de cada una de las muestras, lo cual fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con *GelRed* (Figura 8).

9.3 Amplificación del gen constitutivo β -actina

Las 131 muestras analizadas cumplieron con el control interno de reacción, en las cuales se obtuvo un producto de amplificación de 826 pb correspondiente al gen beta actina, lo cual fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con *GelRed* (Figura 9).

9.4 Identificación de *Leptospira* por PCR punto final

Se identificó la presencia de *Leptospira* mediante la amplificación de un fragmento del gen *lipL32* de 660 pares de bases (Figura 10), obteniendo como resultado 6 muestras positivas correspondientes a los pacientes 27, 28, 45, 47, 49 y 50, representando una positividad del 8.6% (Figura 11).

De los 6 pacientes, 5/6 (83%) son de sexo femenino (27, 28, 45, 47 y 49) y 1/6 (17%) de sexo masculino (50) (Figura 12).

Las muestras biológicas de las 6 personas en las cuales se identificó la presencia de *Leptospira*, corresponden a 4 muestras de sangre correspondientes a los pacientes 27, 28, 45 y 49, y 2 muestras de orina correspondientes a los pacientes 47 y 50 (Figura 13). Se presentó una positividad del 6% en el total de 70 muestras de sangre analizadas (Figura 14), y una positividad del 3.3% en el total de 61 muestras de orina analizadas (Figura 15).

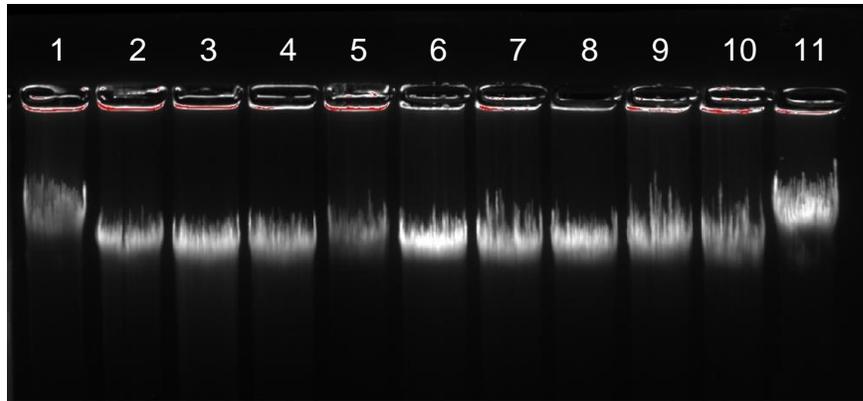


Figura 8. Gel representativo de la extracción de ADN. El ADN de las muestras fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con *Ge/Red*. Los carriles 1-11 corresponden a extracciones de muestras, en los cuales se observa la banda característica del ADN genómico.

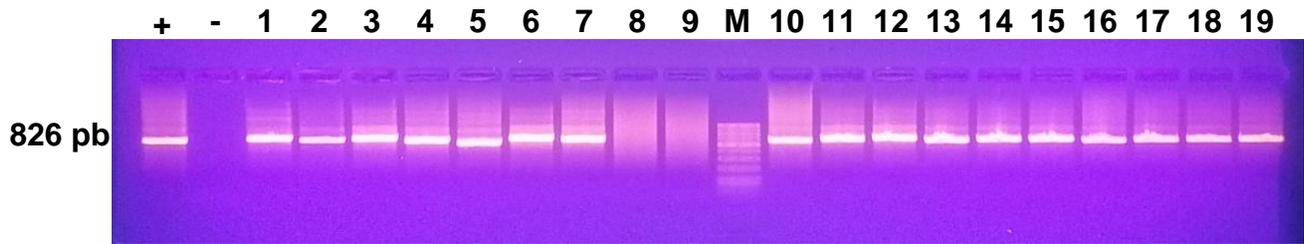


Figura 9. Gel representativo de la amplificación del fragmento del gen constitutivo β -actina. La amplificación del fragmento del gen β -actina, fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con *GelRed*. En el primer carril se observa un producto de amplificación de 826 pares de bases, correspondiente a ADN genómico humano utilizado como control positivo, en el segundo carril un control negativo, en el cual se utilizó agua destilada, seguido de 9 muestras positivas (1-9), un marcador de peso molecular (M), que va de 100 a 1000 pb y 10 muestras positivas (10-19).

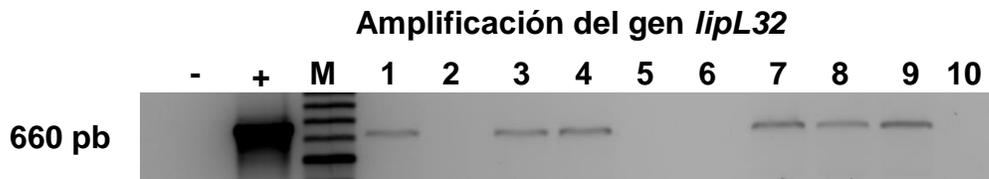


Figura 10. Gel representativo de la amplificación de un fragmento del gen *lipL32*.

La amplificación del fragmento de *lipL32* fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con *GelRed*. Se puede observar en el primer carril un control negativo en el cual se utilizó agua destilada, en el segundo carril un producto de amplificación de 660 pares de bases correspondiente a un control positivo de ADN genómico de *Leptospira interrogans*, seguido de un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases y 6 muestras positivas correspondientes a los carriles 1,3,4,7,8 y 9.

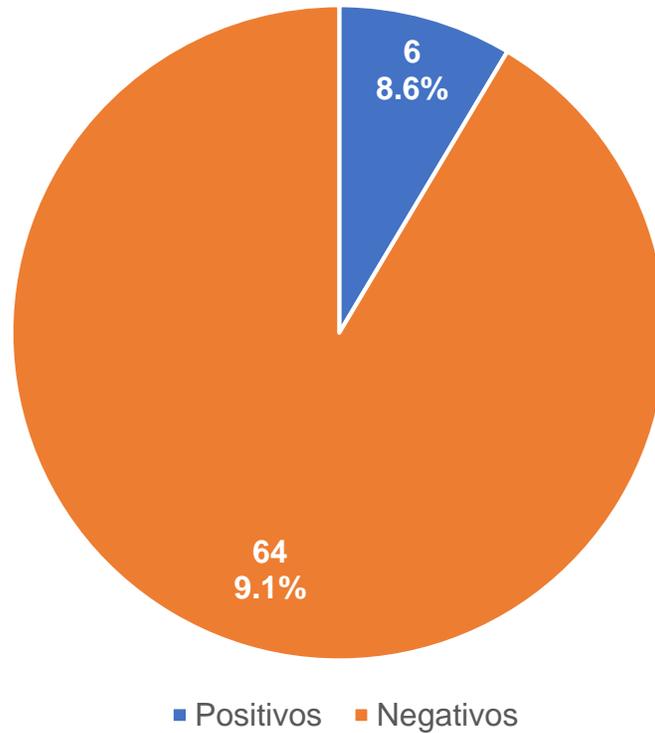


Figura 11. Positividad en la muestra poblacional. Se recolectaron muestras de sangre y orina de 70 personas con sintomatología compatible con leptospirosis, de las cuales se identificó la presencia de *Leptospira* en un total de 6 personas (azul), lo cual representa un 8.6% de positividad, mientras que en las 64 personas restantes no se identificó la presencia de la bacteria (naranja).

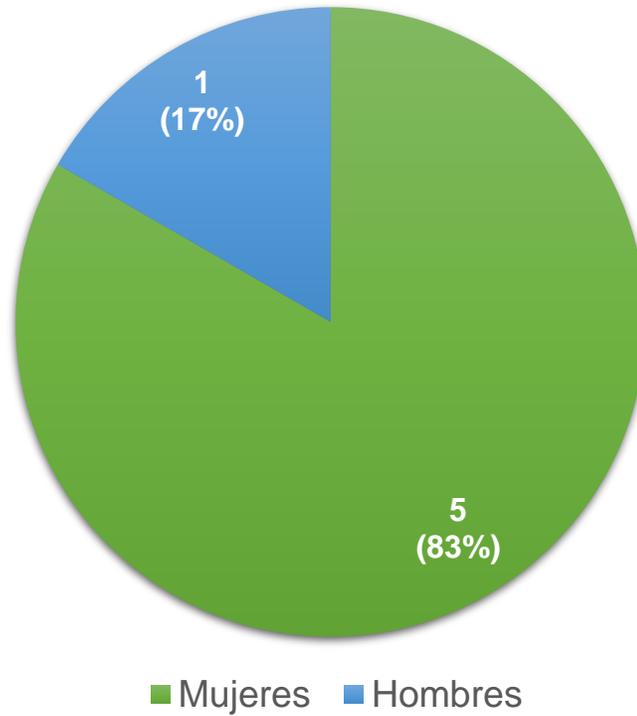


Figura 12. Individuos positivos. De las 6 personas en las cuales se detectó la presencia de *Leptospira*, 5 son mujeres (verde) y 1 hombre (azul).

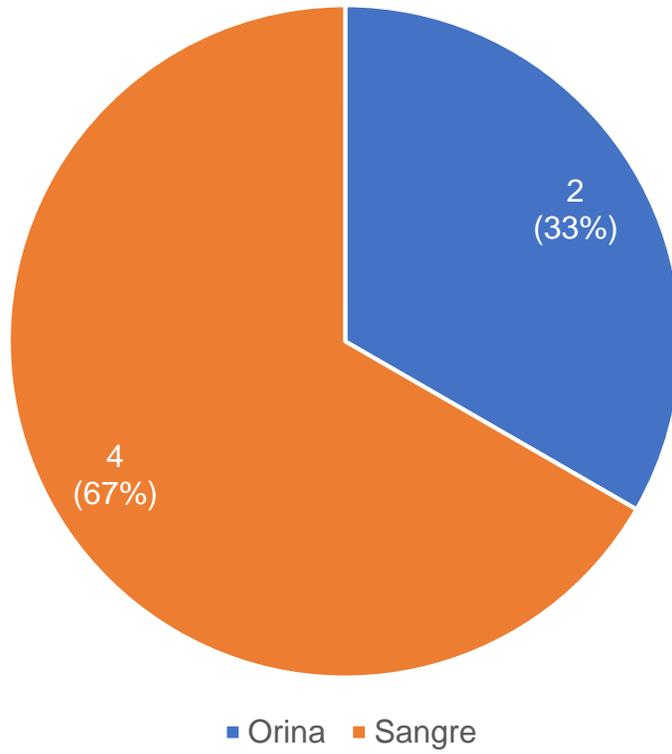


Figura 13. Muestras biológicas positivas. Se identificó la presencia de *Leptospira* en 4 muestras de sangre (naranja) y en 2 muestras de orina (azul).

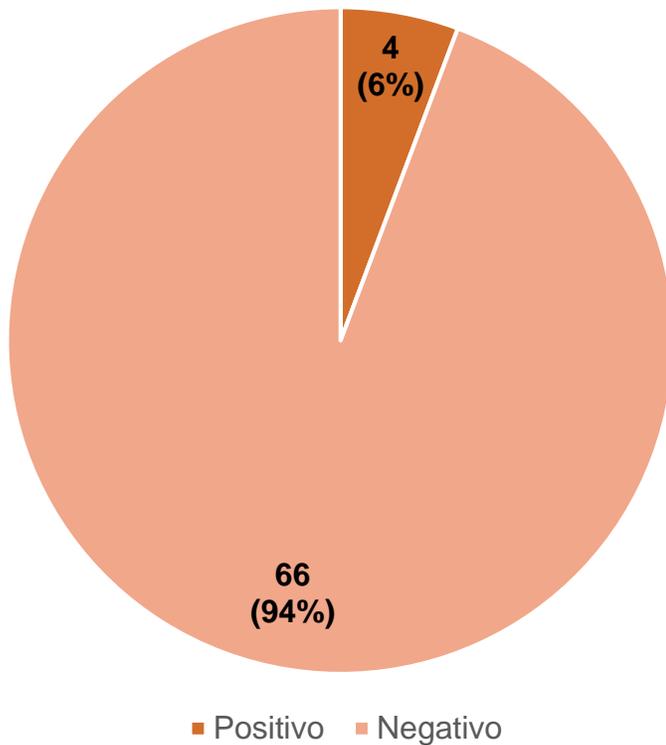


Figura 14. Positividad en Sangre. Se analizaron un total de 70 muestras de sangre de las cuales, en 4 muestras se identificó la presencia de *Leptospira* lo cual representa un 6% de positividad en este tipo de muestra.

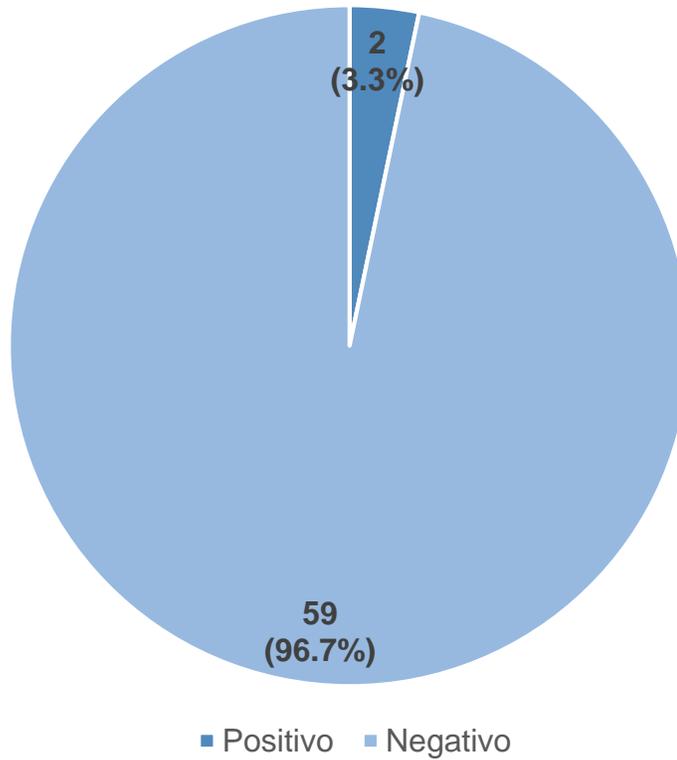


Figura 15. Positividad en orina. Se analizaron un total de 61 muestras de orina de las cuales, se identificó la presencia de *Leptospira* en 2 muestras, lo cual representa un 3.3% de positividad en este tipo de muestra.

9.5 Identificación de especies patógenas de *Leptospira*

Para llevar a cabo la identificación de las especies patógenas de *Leptospira* presentes en las muestras, se amplificó una región del gen *secY* en las muestras en las cuales se identificó la presencia de *Leptospira*, obteniendo como resultado un producto de amplificación de 410 pares de bases las 6 muestras analizadas (Grillova L. *et al.*, 2020) (Figura 16).

Mediante el kit *Wizard genomic dna purification* se obtuvo un producto purificado de 410 pares de bases de cada una de las muestras.

Se obtuvo un solo producto de secuenciación correspondiente a la muestra número 50, el cual fue de 378pb (SecYInerR), el cual obtuvo una similitud del 100% con *Leptospira interrogans*; 92.02% con *Leptospira borgpetersenii*; 82.15% con *Leptospira santarosai*; 91.50% con *Leptospira kirschneri* y 80.74% con *Leptospira mayottensis* (Tabla 2) (Figura 17).

Se construyó un árbol filogenético utilizando un enfoque de máxima verosimilitud, utilizando el alineamiento de cinco especies patógenas del género *Leptospira* (*Leptospira kirschneri*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira mayottensis* y *Leptospira interrogans*), junto a la secuencia SecYInerR, pudiendo observar la estrecha relación que se presenta entre éstas especies (Figura 18)

Leptospira santarosai (EU358035) y *Leptospira mayottensis* (KT338851) presentan una proximidad evolutiva significativa, al formar un clado que se encuentra altamente relacionado. *Leptospira borgpetersenii* (EU358019) se encuentra en un clado intermedio, el cual se encuentra separado del clado anterior y a su vez presenta relación evolutiva

con los demás clados. *Leptospira kirschneri* (CP085133) y *Leptospira interrogans* (CP043884) se agrupan en un clado separado, presentándose una cercanía filogenética entre estas dos especies.

La secuencia SecYInerR y *L. interrogans* (CP043884), presentan una proximidad evolutiva significativa, al formar un clado que se encuentra altamente relacionado.

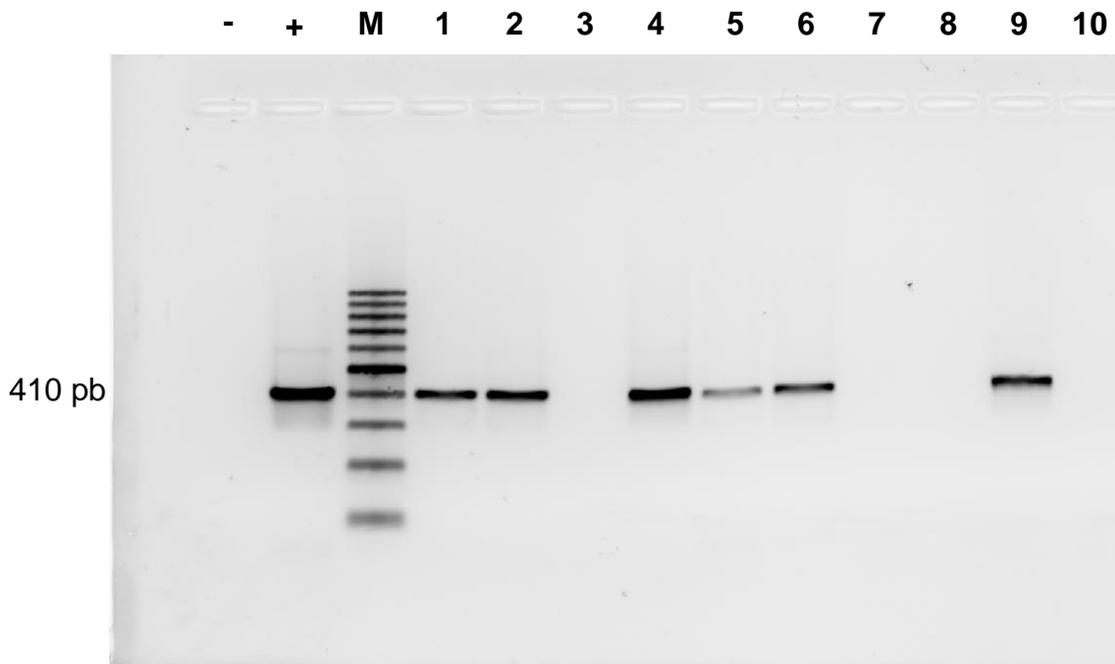


Figura 16. Gel representativo de la amplificación del gen *secY*. La amplificación del gen *secY* fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. En el primer carril se observa un control negativo, en el segundo carril un control positivo (producto de 410 pares de bases), seguido de un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases y 6 muestras positivas correspondientes a los carriles 1, 2, 4, 5, 6 y 9.

Tabla 2. Porcentaje de cobertura e identidad.

	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira santarosai</i>	<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>Leptospira mayottensis</i>	
<i>Leptospira SecYInerR</i>	99%	99%	99%	99%	99%	Porcentaje de cobertura
	100%	92.02%	82.15%	91.50%	80.74%	Porcentaje de identidad

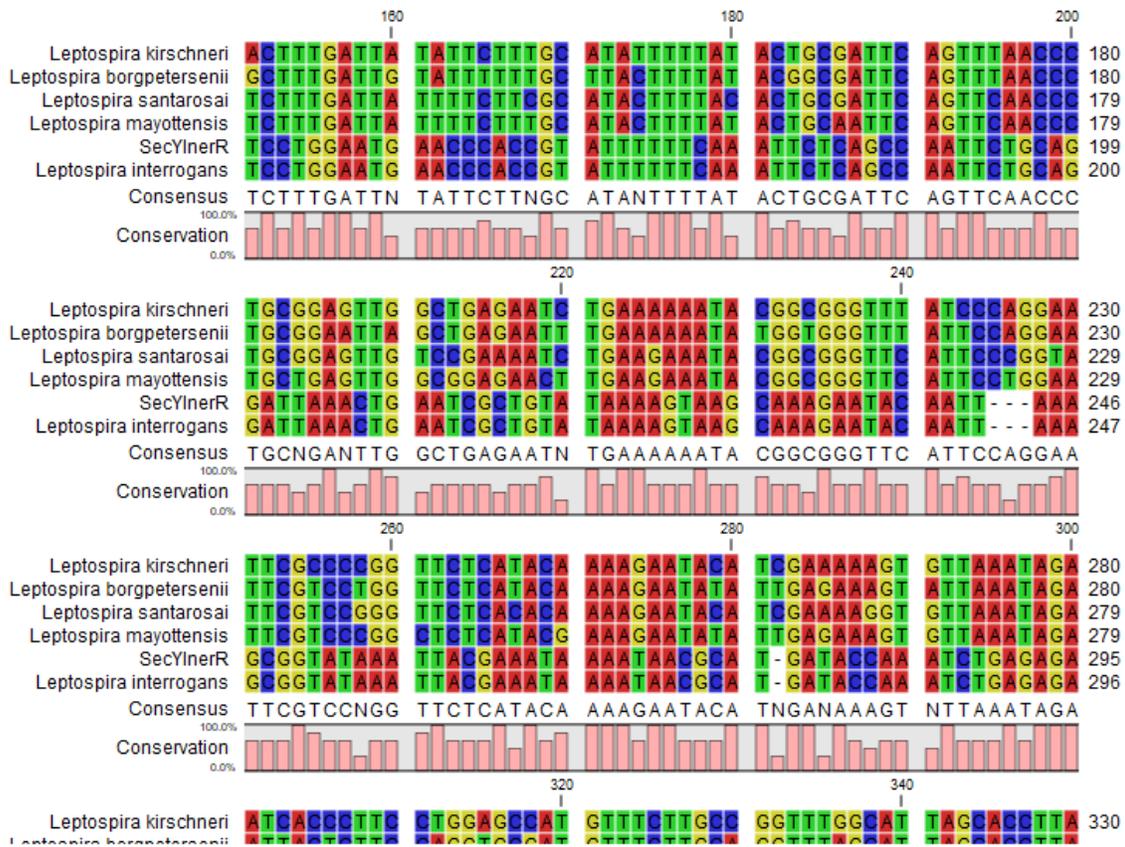


Figura 17. Alineamiento de secuencias. Secuencias de 5 especies de *Leptospira* (*L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. mayottensis* y *L. interrogans*) contra la secuencia obtenida de la muestra número 50 (SecYInerR).

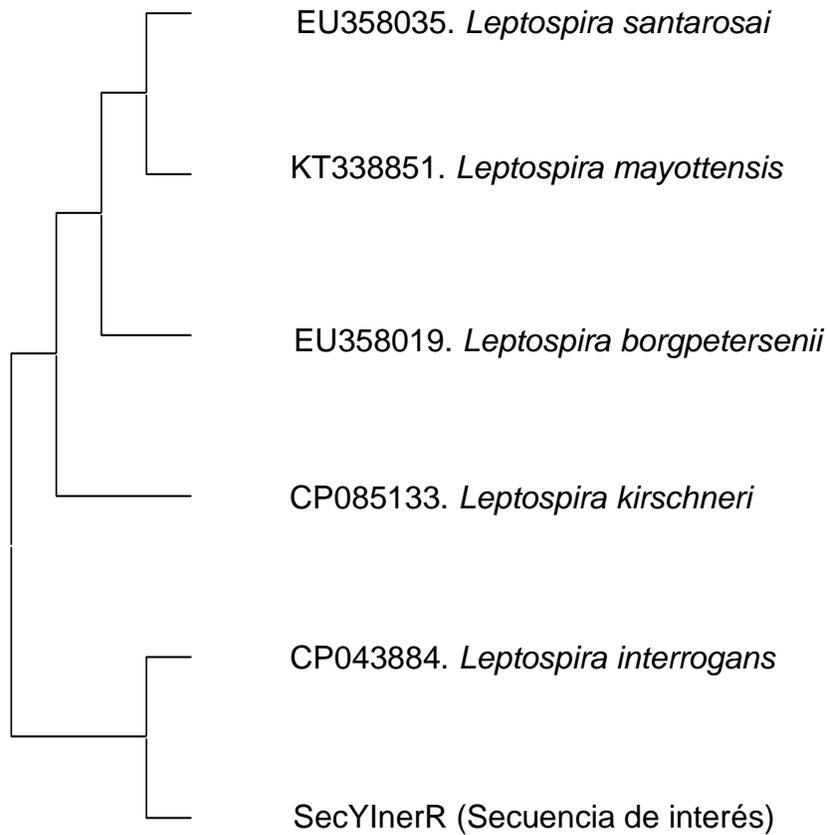


Figura 18. Diversidad genética del gen *secY* del género *Leptospira*. En el presente árbol filogenético podemos observar la proximidad evolutiva entre las diferentes especies patógenas del género *Leptospira* y la secuencia obtenida de la muestra analizada (SecYInerR).

9.6 Análisis Estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS Statistics versión 26 para llevar a cabo un análisis comparativo para evaluar la asociación estadística entre cada variable clínica (género, fiebre, cefalea, mialgia, escalofríos, fotofobia, erupción cutánea, conjuntivitis, ictericia y mareos) y la positividad a la infección, basado en la prueba exacta de Fisher para calcular los valores de p asociados (Tabla 3).

Aunque hubo más casos de mujeres positivas (5/45) en comparación con hombres (1/23), la diferencia no fue estadísticamente significativa (valor de $p = 0.331$).

En cuanto a la fiebre, esta fue reportada en 2 de los pacientes positivos y en 17 de los negativos, con un valor de $p = 0.541$, lo cual nos indica que no se encontró una asociación estadísticamente significativa.

A pesar de que los síntomas más frecuentes en los casos positivos a leptospirosis fueron cefalea y mialgia, no se encontró una asociación estadísticamente significativa obteniendo valores de $p = 0.678$ y 0.361 respectivamente.

VARIABLES como escalofríos, fotofobia, erupción cutánea, conjuntivitis, ictericia y mareos no mostraron asociaciones significativas con la positividad para *Leptospira*. En particular, los mareos tuvieron un valor de p cercano al umbral de significancia (0.058).

Además, se analizaron seis grupos etarios: 0-5 años, 6-11 años, 12-18 años, 19-26 años, 27-59 años, y 60+ años para evaluar su relación con la presencia o ausencia de la infección (Tabla 4).

Pudiendo observar que el mayor número de casos positivos (5), se encontró en el grupo de 27 a 59 años, seguido de 1 caso en el grupo de 60+ años, mientras que en los grupos etarios que se encontraban en el rango de edad de 0-26 años no se reportaron casos positivos (Figura 19).

Los valores de p obtenidos al analizar la asociación de cada grupo etario, fue mayor a 0.05, lo cual indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre los grupos y los casos positivos a *Leptospira*, esto sugiere que, dentro de la muestra analizada, la distribución de positividad no se encuentra asociada con la edad.

Tabla 3. Análisis de variables clínicas y su relación con la positividad para *Leptospira*.

	<i>Leptospira</i>		
	Positivo	Negativo	Valor de <i>p</i>
Género			
Femenino	5	40	0.331
Masculino	1	22	
Fiebre			
Posivo	2	17	0.541
Negativo	4	45	
Cefalea			
Posivo	5	50	0.678
Negativo	1	12	
Mialgia			
Positivo	5	41	0.361
Negativo	1	21	
Escalofrios			
Positivo	0	12	0.235
Negativo	6	50	
Fotofobia			
Positivo	1	5	0.438
Negativo	5	57	
Erupción cutánea			
Positivo	0	3	0.755
Negativo	6	59	
Conjuntivitis			
Positivo	0	2	0.83
Negativo	6	60	
Ictericia			
Positivo	1	5	0.17
Negativo	1	61	
Mareos			
Positivo	2	4	0.058
Negativo	3	59	

Tabla 4. Distribución de casos positivos y negativos de *Leptospira* según los grupos etarios.

Grupos Etarios	<i>Leptospira</i>		Valor de p
	Positivo	Negativo	
0-5	0	1	0.912
6-11	0	1	0.912
12-18	0	8	0.457
19-26	0	3	0.755
27-59	5	39	0.303
60+	1	10	0.668

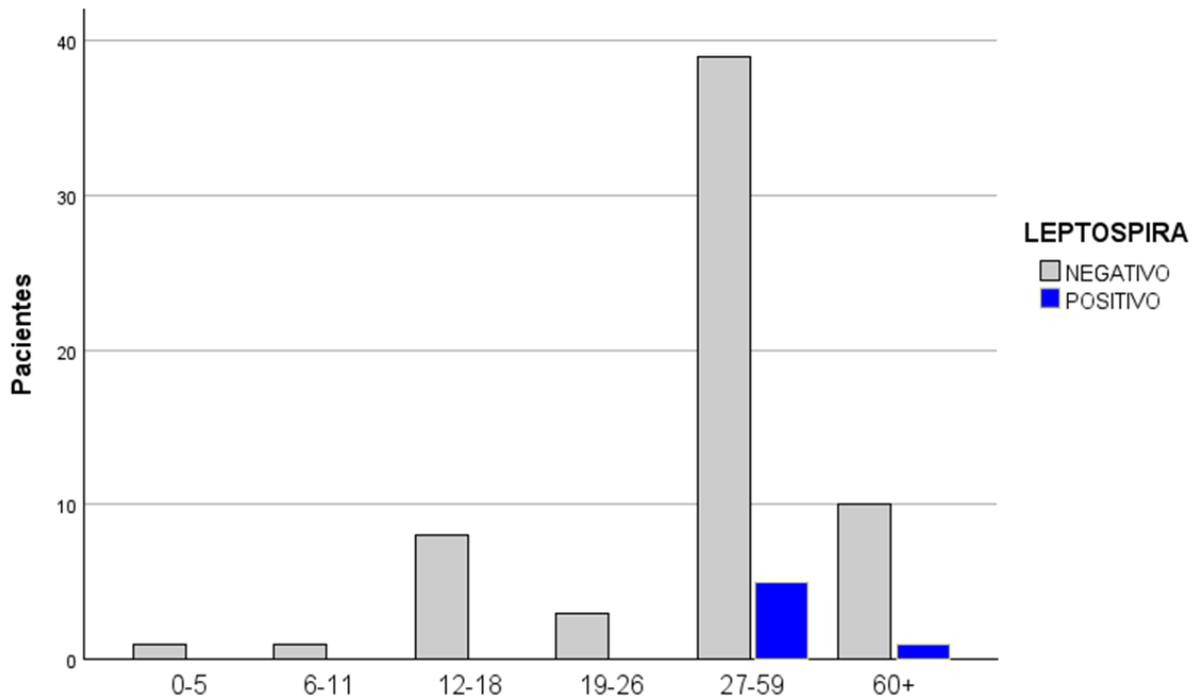


Figura 19. Casos positivos y negativos a leptospirosis acorde a los grupos etarios.

En el presente gráfico podemos observar que la presencia de mayor número de casos positivos de leptospirosis fue en el grupo etario de 27 a 59 años con un total de 5 casos positivos, seguido del grupo etario de 60+ años en el cual se presenta 1 caso positivo.

X. DISCUSIÓN

La leptospirosis es una de las enfermedades zoonóticas de importancia en el mundo, principalmente en países que se encuentran en zonas tropicales y subtropicales como México, el cual reúne las condiciones climatológicas y socioeconómicas que favorecen la persistencia y transmisión de *Leptospira* (Ko *et al.*, 2009). Pese a que la infección puede ser asintomática, la sospecha que se presente una infección por *Leptospira* se basa principalmente en los signos y síntomas del paciente, así como en los datos epidemiológicos (Levett PN., 2001). Debido a que el cuadro clínico de leptospirosis se puede confundir con otras infecciones, es imperativo realizar un diagnóstico adecuado y en tiempo apropiado para la administración del tratamiento, de lo contrario. La enfermedad puede conducir a un cuadro clínico grave con posibilidad de ser letal (Levett PN., 2007).

En México, el principal problema para la prevención y el control de la infección es el diagnóstico, ya que la metodología comúnmente implementada para llevar a cabo este diagnóstico se basa principalmente en el cultivo de la bacteria, que suele ser de tiempo prolongado y difícil crecimiento bacteriano, y la prueba de microaglutinación (MAT), las cuales han demostrado limitaciones significativas (Villa Espinosa, 2013; Guerra *et al.*, 2020). También es común realizar el diagnóstico mediante microscopía de campo oscuro; sin embargo, también presenta dificultades pues se requiere pericia del personal del laboratorio químico clínico para evitar falsos positivos. En este contexto, el uso de técnicas moleculares como la PCR, permite un diagnóstico temprano y preciso de la infección, lo cual agiliza la administración de un tratamiento oportuno para controlar la infección bacteriana y a su vez promueve la recuperación exitosa de los pacientes

(Ooteman, *et al*, 2006). Sin embargo, es importante considerar el tipo de muestra que se debe analizar, pues puede encontrarse en sangre o en orina, por lo que lo ideal es que siempre se analicen ambas muestras para las técnicas de PCR.

La implementación de muestras de sangre y orina para llevar a cabo el diagnóstico de leptospirosis, nos permite abordar las diferentes fases de la infección, debido a la naturaleza bifásica de ésta. Durante la primera fase (leptospiremia), *Leptospira* se encuentra circulando en el torrente sanguíneo (Stoddard et al., 2009). Por otro lado, en la segunda fase (leptospiruria) la bacteria se establece en los riñones y es excretada mediante la orina (Ahmed et al., 2012).

Los resultados de nuestro estudio reportaron una positividad del 8.6%, lo cual supera la positividad de 3.23% encontrada por Hernández y colaboradores en 2020, en su investigación realizada al igual que nosotros en Culiacán, Sinaloa. Esto podría atribuirse a las metodologías empleadas en ambos estudios. En nuestro caso, se implementó la técnica de PCR dirigida al gen *lipL32* lo cual permitió una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de *Leptospira* patógenas, pues este gen no lo presentan las especies saprófitas. Por el contrario, Hernández utilizó la técnica de MAT, reconocida como el “estándar de oro”, pero que presenta limitaciones, ya que, la sensibilidad de ésta puede ser menor en comparación con técnicas moleculares, especialmente en etapas tempranas de la infección. Además, que las muestras analizadas por ellos correspondían a donadores de sangre de hospitales públicos, sin enfocarse en sintomatología de los pacientes como fue en nuestro caso.

En nuestro estudio se utilizó una n=70, en el cual encontramos una positividad del 6% en las muestras de sangre, así mismo encontramos una positividad del 3.3% en las muestras de orina analizadas. Lo cual contrasta con un estudio realizado por Cardona y colaboradores en 2008, que a pesar de que, así como en nuestro estudio implementaron PCR para llevar a cabo la identificación de *Leptospira*, en las muestras analizadas y con una n=73 similar a la nuestra, encontraron una positividad del 21.9% en las muestras de sangre y una positividad del 32.8% en las muestras de orina, lo cual puede ser debido a que los pacientes presentaban una sintomatología más específica para la infección, los cuales presentaron en su mayoría tanto fiebre, como cefalea, mialgias, vómito, diarrea, astenia, decaimiento e ictericia; mientras que en nuestro grupo de estudio incluimos a personas que presentaran por lo menos uno de los síntomas en cuestión (Cardona, *et al.* 2008).

El predominio de casos positivos de leptospirosis en mujeres (83%) contrasta con algunos estudios que indican una distribución más equilibrada o incluso un predominio masculino, posiblemente asociado con actividades ocupacionales en zonas rurales (Haake & Levett, 2015). Sin embargo, este resultado podría reflejar sesgos específicos de la muestra estudiada ya que, en la muestra poblacional en nuestro estudio hubo predominio del sexo femenino, siendo un total de 46 mujeres (66%) y en su minoría hombres con un total de 24 hombres (34%).

La ausencia de significancia estadística al analizar las variables clínicas en relación con los casos positivos podría deberse a un tamaño muestral limitado. Asimismo, este resultado sugiere la necesidad de investigar otros factores clínicos o epidemiológicos que

puedan tener mayor relevancia en la predicción de la positividad, tales como variables contextuales o ambientales (Cohen, 1992; Field, 2018).

Por otro lado, se observó que la mayoría de los casos positivos se encuentran en adultos de entre 27 y 59 años. Este hallazgo podría estar asociado que este grupo etario corresponde a la población en edad laboral activa, lo cual los expone a factores ocupacionales o actividades de riesgo, lo cual incrementa la posibilidad de entrar en contacto con la bacteria y contraer la infección (World Health Organization [WHO], 2020; Rodríguez et al., 2019).

Los resultados de este estudio muestran la oportunidad de determinar la patogenicidad de las especies de *Leptospira* identificadas en un paciente con cuadro febril de origen desconocido, pues eventualmente el cuadro clínico puede ser causado por otro tipo de bacteria, incluyendo infecciones virales como la causada por el virus dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Chikungunya (ChV), entre otros patógenos que puedan presentarse como co-infección, y cuyas manifestaciones clínicas pueden confundirse entre los pacientes, lo que impacta en la administración del tratamiento. Es importante mencionar que, con la metodología descrita en este trabajo, no sólo se identifica la infección mediante PCR, sino que además, se define que se trate de una *Leptospira* patógena, pues el gen lipL32 lo poseen sólo las especies patógenas, no así las especies saprófitas. Esto representa una oportunidad para la implementación de esta metodología en el sector salud local y nacional.

XI. CONCLUSIONES

1. Se reportó una frecuencia de infección por *Leptospira* del 8.6% entre la población sinaloense analizada. En muestras sanguíneas se obtuvo cuatro muestras positivas de un total de 70 muestras de sangre analizadas, correspondiente a una positividad del 6%, mientras que en muestras de orina se obtuvieron dos muestras positivas de un total de 61 muestras de orina analizadas, correspondiente a una positividad del 3.3%.
2. Los análisis de las secuencias de los productos de PCR muestran que la especie *Leptospira* identificada corresponde a *L. interrogans* como agente causal de la infección.
3. No se encontró relación estadísticamente significativa al analizar las variables clínicas y grupos etarios en relación a los casos positivos.

XII. PERSPECTIVAS

Realizar un estudio en el que se analicen muestras de un mayor número de personas con sintomatología compatible con leptospirosis, para con ello evaluar si las tendencias observadas se mantienen en una muestra mayor.

Incluir personas cuya sintomatología sea más compleja, es decir, que presenten un mayor número de manifestaciones clínicas compatibles con leptospirosis.

Analizar muestras de agua de diversos sectores de los ríos presentes en la ciudad para con ello identificar posibles focos de infección.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, A., Engelberts, M. F., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2012). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE*, 7(11), e52277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052277>
- Akhtar, T., Naeem, M. I., Younus, M., Nisa, Q. U., Ahmad, H. M., Wazir, N., & Tanveer, K. (2023). Dog-mediated leptospirosis. *Zoonosis, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan*, 4, 356-368.
- Bautista B., María, D., Zootec, L. B., Alexander, H., María, A., & Orlando, M. (2019). Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 11(2), 108-118.
- Browne, E. S., Pereira, M., Barreto, A., Zeppelini, C. G., Oliveira, D., & Costa, F. (2023). Prevalence of human leptospirosis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e126.
- Cardona, M. N., Moros, R. M., López, E. A., Pérez, J. L., & Hernández, R. C. (2008). Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28(1), 24-30.
- Chacon, P. A. M. (2015). REPORTE DE CASO. *Revista Medica Basadrina*, 9(1), 37-40.

Cohen, J. (1992). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.

Di Azevedo, M. I. N., & Lilenbaum, W. (2021). An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology*, 72(5), 496-508.

Field, A. (2018). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (5th ed.). Sage.

Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., et al. (2016). What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of *Leptospira* reveals mechanisms for infection and persistence in the environment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

Goarant, C., Girault, D., Thibeaux, R., & Soupé-Gilbert, M. E. (2020). Isolation and Culture of *Leptospira* from Clinical and Environmental Samples. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2134, 1–9. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_1

Guerra, M. A., Rodríguez, F., & Ramírez, R. (2020). Diagnóstico molecular de *Leptospira* en muestras de sangre y orina de pacientes en Baja California. *Acta Universitaria*, 30(1), 45-55. <https://doi.org/10.15174/au.2020.1625>

Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

- Hernández-Ramírez, C., Gaxiola-Camacho, S., Enríquez-Verdugo, I., Rivas-Llamas, R., & Osuna-Ramírez, I. (2020). *Leptospira* Serovars and of contagion risks in humans and dogs from Culiacan City, in Sinaloa, Mexico. *Abanico veterinario*, 10.
- Hsu, S. H., & Yang, C. W. (2022). Insight into the structure, functions, and dynamics of the leptospira outer membrane proteins with the pathogenicity. *Membranes*, 12(3), 300.
- Joya, L. C., Gutiérrez, D. L., Hurtado, W. M., & Gama, J. M. (2015). *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. *Biociencias*, 10(2), 65-80.
- Karpagam, K. B., & Ganesh, B. (2020). Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(5), 835–846.
- Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 736-747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- Lagarde-Guerrero R. (2019). Implementación de un método basado en PCR-RFLPs para la identificación de especies patógenas de *Leptospira* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa].
- Lagarde Guerrero, R. (2024). Análisis de proteínas de membrana de *Leptospira* e identificación molecular en muestras biológicas del municipio de Culiacán, Sinaloa [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa].

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296–326.

Levett PN. *Leptospira*. In: BJ MPR, Jorgensen JH, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. p. 963–70.

Md-Lasim, A., Mohd-Taib, F. S., Abdul-Halim, M., Mohd-Ngesom, A. M., Nathan, S., & Md-Nor, S. (2021). Leptospirosis and coinfection: should we be concerned?. *International journal of environmental research and public health*, 18(17), 9411.

Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods.* 2006;65(2):247–57.

Ospina-Pinto, M. C., & Hernández Rodríguez, P. (2015). Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. *Revista cubana de medicina tropical*, 67(3), 0-0.

Pérez Elias, Y., Obregón Fuentes, A. M., Rodríguez Reyes, I. D. C., González, A., & Julia, M. (2015). Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(4), 0-0.

Philip, N., Affendy, N. B., Masri, S. N., Yuhana, M. Y., Than, L. T. L., Sekawi, Z., & Neela, V. K. (2020). Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. *PloS one*, 15(9), e0239069.

Picardeau M. (2020). *Leptospira* and Leptospirosis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2134, 271–275. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_24

- Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., ... & Adler, B. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS one*, 3(2), e1607.
- Podgoršek, D., Ružić-Sabljić, E., Logar, M. *et al.* Evaluation of real-time PCR targeting the *lipL32* gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiol* 20, 59 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>
- Rajapakse S. (2022). Leptospirosis: clinical aspects. *Clinical medicine (London, England)*, 22(1), 14–17. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>
- Rodríguez, M., Pérez, A., & López, G. (2019). Factores ocupacionales y salud pública en adultos. *Revista de Epidemiología y Salud Pública*, 12(3), 45-58.
- Romero-Vivas, C. M., & Falconar, A. K. (2016). *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 123-143.
- Scialfa, E., Rivero, M., Moreno, S., Ortiz, M., & Bongiorno, F. (2020). Microscopic agglutination test: Variables that affect the time of serological confirmation of human leptospirosis cases. *Revista Argentina de microbiología*, 52(4), 278–282.
- Soo, Z., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2020). Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta tropica*, 201, 105183.

- Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR targeting the *LipL32* gene. *PLoS ONE*, 4(6), e7032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007032>
- Torres-Castro, M., Febles-Solís, V., Hernández-Betancourt, S., Noh-Pech, H., Estrella, E., Peláez-Sánchez, R., ... & Sosa-Escalante, J. (2020). *Leptospira* patógena en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. *Revista MVZ Córdoba*, 25(2), 17-26.
- Torres-Castro, M., Hernández-Betancourt, S., Agudelo-Flórez, P., Arroyave-Sierra, E., Zavala-Castro, J., & Puerto, F. I. (2016). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(5), 620-625.
- Verma, V., Goyal, M., Kala, D., Gupta, S., Kumar, D., & Kaushal, A. (2020). Recent advances in the diagnosis of leptospirosis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 25(9), 1655-1681.
- Villa Espinosa, A. (2013). Diagnóstico molecular de leptospirosis mediante PCR en tiempo real dirigida al gen *lipL32*. *BMC Microbiology*. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-111>
- World Health Organization. (2020). *Occupational health: A global perspective*. WHO Press.

XIV ANEXOS

14.1 Encuesta epidemiológica y consentimiento informado



Protocolo de Vigilancia de Leptospirosis

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA DE LEPTOSPIROSIS

DATOS DEL PACIENTE

Nombre y apellidos del paciente: _____

Fecha de nacimiento: __/__/__ Edad en años: ____ Edad en meses en menores de 1 año: ____ Sexo: Hombre Mujer

País de nacimiento: _____

Lugar de residencia:

País: _____ Estado: _____ Municipio: _____ Código postal: _____

Dirección: _____

Nombre y dirección de la empresa: _____

Tarea en el trabajo: _____

DATOS DE LA ENFERMEDAD

Fecha de inicio de síntomas: __/__/__

Manifestación clínica (marcar todas las opciones que correspondan):

Cefalea Conjuntivitis Erupción cutánea Escalofríos Fallo renal Fiebre Hemoptisis y síntomas respiratorios
Hemorragias Ictericia Meningitis Mialgia Miocarditis

Hospitalizado : Sí No

Defunción: Sí No

DATOS DE LABORATORIO

Fecha de diagnóstico de laboratorio: __/__/__

Agente causal (marcar una de las siguientes opciones):

Leptospira interrogans Leptospira spp Leptospira, otras especies _____

Muestra (marcar la muestra principal con resultado positivo): _____

LCR Líquido peritoneal Orina Sangre

Prueba (marcar la prueba positiva en la muestra principal):

Ácido Nucleico, detección Aislamiento Anticuerpo, seroconversión Anticuerpo, IgM Inmunofluorescencia

Fecha y títulos 1ª muestra _____

Fecha y títulos 2ª muestra _____

Envío de muestra al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR): Sí No

Identificador de muestra del declarante al LNR: _____ Identificador de muestra en el LNR: _____

DATOS DEL RIESGO

Ocupación de riesgo (marcar una de las siguientes opciones):

Manipulador de alimentos Manipulador de animales Medioambiental: agua Medioambiental: animal

Medioambiental: suelo Trabajador de la construcción Trabajador de laboratorio Trabajador en barco

Otro: _____

Exposición (marcar las principales si no se ha identificado un único mecanismo de transmisión):

Aerosol Aire (excepto aerosoles) Aguas recreativas Lesión ocupacional Contacto con animal, tejidos de animales, o derivados Otra: _____

Animal

sospechoso: _____

Ámbito de exposición:

Aguas costeras Alcantarillado Boscoso Fuente Fosa séptica Humedal Inundación Lago
Pozo Río Rural Selvático Terreno encharcado Urbano

Datos de viaje

Viaje durante el periodo de incubación: Sí No

Lugar del viaje: País: _____ Estado: _____ Municipio: _____

Fecha de ida: ___/___/___ Fecha de vuelta ___/___/___

CATEGORIZACIÓN DEL CASO

Clasificación del caso (marcar una de las siguientes opciones):

Probable Confirmado

Criterios de clasificación de caso:

Criterio clínico Sí No

Criterio epidemiológico Sí No

Criterio de laboratorio Sí No

Asociado:

A brote: Sí No

Identificador del brote: _____

OBSERVACIONES

Consentimiento del paciente:

Se me ha informado sobre el proyecto y por mi propia voluntad otorgo mi consentimiento para que el material biológico recolectado sea elemento de estudio, siempre y cuando se respete la confidencialidad sobre el origen de la muestra en caso de que los resultados de la investigación sean publicados en foros científicos o en medios impresos.

Firma del paciente

Firma del responsable

XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

Ab: Anti body

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CFU: Unidades formadoras de colonias

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

EMJH: Ellinghausen- McCullough-Johnson- Harris

FCQB: Facultad de Ciencias Químico Biológicas

G: Gravedades

IgG: Inmuno globulina G

IgM: Inmuno globulina M

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

IV: Intravenosa

Kb: Kilo bases

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MAT: Microaglutinación

µL: Microlitro

mL: Mililitro

Min: Minuto

PBS: Buffer fosfato salino

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ribosomal RNA

Rpm: Revoluciones por minuto

Seg: Segundo

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SNC: Sistema Nervioso Central

Sol: Solución

TE: Tris- EDTA

UV: Ultra Violeta