

ARTÍCULOS ORIGINALES

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO, ECUADOR

Adaptación de *Leptospira interrogans* (*sensu stricto*) al agua dulce

Dr. Gabriel Trueba,¹ Dra. Sonia Zapata,² Dr. Kleber Madrid³ y Nicolás Peñafiel⁴

RESUMEN

Se describió un estudio acerca de la adaptación de *Leptospira interrogans* a medios acuosos carentes de nutrientes. Para este propósito se incubaron leptospiras por período de tiempo indeterminado en agua destilada y en solución salina tamponada. Las leptospiras se mantuvieron viables en agua por 98 d, mientras que, las incubadas en solución salina tamponada sobrevivieron únicamente 3 semanas. Los componentes proteicos celulares y de membrana externa fueron analizados mediante electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE). Cuando se compararon los perfiles de proteínas de OM de leptospiras mantenidas en agua, con aquellos perfiles de OM de células cultivadas en medio EMJH, se observaron algunas diferencias. Una proteína de 56 kDa estuvo presente en leptospiras que fueron mantenidas en agua por una semana. Mediante análisis de *western blot* se identificó a esta proteína como GroEL.

DeCS: LEPTOSPIRA INTERROGANS/aislamiento & purificación; CONTAMINACION DEL AGUA; FACTORES DE RIESGO; MEDIOS DE CULTIVO; LEPTOSPIROSIS/epidemiología; LEPTOSPIROSIS/microbiología; AGUA DULCE.

Las especies patógenas de la espiroqueta *Leptospira*, se encuentran en la naturaleza asociadas a riñones de animales portadores, principalmente mamíferos¹. Estas bacterias son los agentes causales de una de las zoonosis más difundidas en el mundo, cuyos síntomas pueden ir desde una enfermedad similar a la influenza a una infección hemorrágica potencialmente fatal.

Se ha demostrado que las especies patógenas pueden sobrevivir en agua o suelo húmedo por

períodos prolongados de tiempo de 15 a 74 d,^{2,3} pero muy poco se sabe acerca de la posible capacidad de esta bacteria para multiplicarse en estos medios.

Brotos recientes han puesto de evidencia la importancia del agua dulce como fuente de infección de leptospirosis humana.⁴⁻⁸ El propósito de este estudio fue investigar *in vitro*, la capacidad adaptativa de *Leptospira* a la carencia de nutrientes y baja osmolaridad del agua dulce.

¹ Doctor en Microbiología.

² Especialista en Bioquímica.

³ Máster en Biología Molecular.

⁴ Estudiante.

MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Leptospira interrogans serovar canicola fue cultivada en medio EMJH por aproximadamente 10 d (fase logarítmica). Las células bacterianas fueron centrifugadas a 7 000 g por 10 min, el sobrenadante fue eliminado y las células resuspendidas en agua destilada estéril pH 7,2, o solución salina fosfatada (PBS, pH 7,2). Ensayos adicionales se realizaron con agua proveniente de lluvia y de lagunas naturales y artificiales (esterilizada por medio de filtro de 0,2 mm). Los conteos celulares fueron llevados a cabo periódicamente con la utilización de una cámara *Petroff Hauser*. Durante el conteo de bacterias, la motilidad de las células también fue evaluada.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACILAMIDA (SDS-PAGE)

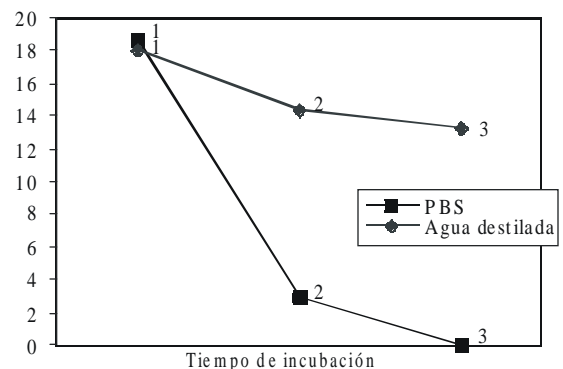
Las células bacterianas fueron cosechadas mediante centrifugación bajo similares condiciones a las anteriormente indicadas, las células fueron lavadas 2 veces con solución salina fosfatada. Análisis electroforéticos de perfiles proteicos de toda la célula y de membrana externa fueron llevados a cabo. Para la extracción de membrana externa se utilizó un método publicado anteriormente.⁹ Las células lavadas fueron resuspendidas en 1 mL de una solución 10 mM de Tris (pH 7,4), a lo que se añadió Triton X114 hasta una concentración de 0,1 % y se le permitió reaccionar por 1 h, luego se centrifugó la mezcla a 14 000 g por 30 min, y se aspiró el sobrenadante, que contuvo los componentes de membrana externa. Análisis de *western blot* fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito¹⁰ y se utilizaron anticuerpos de conejo contra la proteína GroEL de *Escherichia coli* (*Stressgen Biotechnologies*, Canadá)

RESULTADOS

Las leptospiras incubadas en agua destilada demostraron muy poca alteración, a pesar del cambio osmótico y la carencia de nutrientes a que fueron sometidas. Los conteos bacterianos

mostraron en muchas ocasiones incluso elevación en el número de espiroquetas durante la segunda a quinta semana de incubación (fig. 1). La viabilidad (presencia de movilidad giratoria y aparente proceso de división celular) de algunas de estas bacterias fue observada durante 98 d de incubación en agua destilada. Estas espiroquetas mostraron una aparente disminución del volumen celular. Similares resultados se obtuvieron cuando las bacterias fueron incubadas en agua de lluvia estéril. Las espiroquetas incubadas en PBS, mostraron menor vitalidad, los conteos bacterianos disminuyeron en forma drástica (fig. 2) y no se pudieron detectar células viables luego de 3 semanas de incubación. El agua de lagunas no permitió la supervivencia de leptospiras, a pesar de tener un pH que osciló de 7,5 a 8,0. Se observó que la contaminación con ciertas bacterias ambientales destruye rápidamente a las leptospiras (datos no documentados en este escrito).

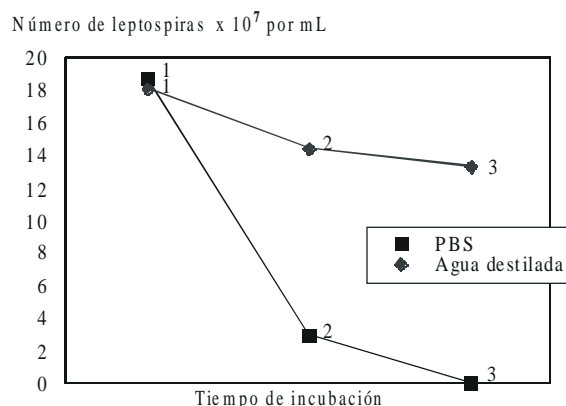
Número de leptospiras $\times 10^7$ por mL



1: lectura luego de 3 d de incubación; 2: lectura luego de 10 d de incubación; 3: lectura luego de 17 d de incubación.

Fig. 1. Número de leptospiras activas durante incubación en agua destilada pH 7,2.

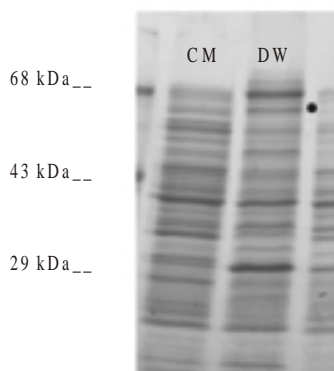
Los estudios electroforéticos de células completas no demostraron en forma consistente la expresión de proteínas durante la incubación en agua. Sin embargo, cuando se analizaron los extractos de membrana externa se pudieron encontrar múltiples diferencias, entre las que se destacó una banda de 56 kDa (fig. 3). El análisis de *western blot* de las membranas externas y cilindros protoplasmáticos de *Leptospira* identificó a la proteína de 56 kDa, como proteína GroEL de *Leptospira* (fig. 4).



1: lectura luego de 3 d de incubación; 2: lectura luego de 10 d de incubación; 3: lectura luego de 17 d de incubación.

Fig. 2. Comparación de supervivencia de *Leptospira* incubada en agua destilada (pH 7,2) y PBS (pH 7,2).

Fig. 3. Perfil de proteínas de membrana externa de células de *Leptospira*, incubadas en medio de cultivo (CM) y en agua destilada (DW). Las membranas fueron corridas en un gel de acilamida (SDS-PAGE) y teñidas con azul de Coomassie. Los números a la izquierda indican la localización de los estándares de tamaño. El punto negro indica la localización de la proteína de 56 kDa.



MM: membrana de células cultivadas en medios de cultivo; MP: cilindro protoplasmático de células cultivadas en medio de cultivo; WM: membrana de células incubadas en agua; WP: cilindro protoplasmático de células cultivadas en agua; SM: membrana externa de células incubadas en solución salina; SP: cilindro protoplasmático de células incubadas en solución salina.

Fig. 4. Análisis de *western blot* de proteínas de membrana externa y cilindro protoplasmático de *Leptospira*, con la utilización de anticuerpo de conejo contra proteína GroEL de *Escherichia coli*.

DISCUSIÓN

La *Leptospira* patógena es un habitante de los riñones de muchos mamíferos donde la concentración de NaCl es cercana a 0,85 %. Se esperaba, por lo tanto, que las leptospiros sobrevivieran en mejores condiciones en PBS que en agua. Estos resultados sugieren que *Leptospira* tiene una capacidad especial de adaptación al agua.

Adicionalmente, *Leptospira* patógena parece tener una capacidad de resistencia a la carencia de nutrientes superior a otros patógenos bacterianos e incluso géneros adaptados al agua como el *Vibrio*.¹¹ Otros tipos de géneros bacterianos patógenos responden a la carencia de nutrientes produciendo formas vivas, no cultivables,¹² sin embargo, *Leptospira* parece mantenerse activa con motilidad rotativa y cultivable por períodos de tiempo posiblemente superiores a 98 d. La inducción de ciertas proteínas, durante la incubación en agua, podría ser un artefacto causado por choque osmótico durante extracción de membrana externa. La proteína chaperona GroEL normalmente se encuentra en el citosol bacteriano (cilindro protoplásmico), y apareció en el extracto de membrana externa de células incubadas en agua (fig. 4).

Estos resultados sugieren que *Leptospira* puede permanecer en agua por largos períodos de tiempo, con una tasa de crecimiento relativamente baja. Es posible que *Leptospira* pueda utilizar nutrientes de leptospiros muertas (crecimiento críptico),¹³ lo que explicaría el aparente aumento de células durante la incubación en agua (fig. 1). Un similar aumento en el número de leptospiros ha sido reportado durante estudios de supervivencia de leptospiros patógenas en suelo.²

Es posible también que las leptospiros patógenas interactúen con ciertos organismos ambientales acuáticos e incluso los utilicen como fuente de nutrientes como ocurre con *Vibrio cholerae*.¹⁴ Cuando se realizaron cultivos de *Leptospira* con organismos ambientales, esta espiroqueta se encontró asociada con material viscoso, probablemente perteneciente a la cápsula de bacterias fotosintéticas como *Gloeotheca sp.* Sin embargo *Leptospira* demostró ser muy sensible a ciertas bacterias ambientales que proliferan rápidamente en el agua. Estos estudios sugieren

que la lluvia incrementa la posibilidad de supervivencia y posiblemente la multiplicación de *Leptospira* patógena en el medio ambiente, al diluir las sales y los metabolitos microbianos. Otros autores han encontrado que las corrientes de agua y los arroyos son mucho más peligrosos que acumulaciones de agua estática, posiblemente más ricas en bacterias ambientales y con mayores concentraciones de sales.

AGRADECIMIENTOS

A Rudy Hartskeerl y Albert Ko por su valiosa ayuda.

Este trabajo es parte del proyecto P-BID 414 financiado por el Banco Interamericano de Desarrollo mediante la Fundación para la Ciencia y la Tecnología (FUNDACYT) del Ecuador.

SUMMARY

The contact with polluted waters is one of the main risk factors to catch leptospirosis. A study is presented about the adaptation of *Leptospira interrogans* to nutrient-lacking water media. For this end, leptospire were incubated in distilled water and tampon saline solution for an undetermined period of time. Leptospire kept viable in water for 98 days whereas the incubated ones in tampon saline solution survived 3 weeks only. Protein cellular and external membrane components were analyzed with electrophoresis in acrylamide gel (SDS-PAGE). When OM protein profiles of leptospire kept in water were compared to those OM profiles of cells cultured in ENJA medium, some differences were observed. A 56 kDa protein was present in leptospire kept in water for a week. This protein was identified as GroEL through Western Blot test.

Subject headings: LEPTOSPIRA INTERROGANS/isolation & purification; WATER POLLUTION; RISK FACTORS; CULTURE MEDIA; LEPTOSPIROSIS/epidemiology; LEPTOSPIROSIS/microbiology; FRESH WATER.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faine S, Adler B, Bolin C, Prolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999.
2. Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA. Results of studying the time of survival of pathogenic *Leptospira* under natural conditions. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1973;17:339-45.
3. Zaitsev SV, Chernukha IG, Evdokimova OA, Belov AS. Survival rate of *Leptospira pomona* in soil at a natural leptospirosis focus. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1989;2:64-8.
4. CDC. Outbreak of acute febrile illness among participants in EcoChallenge Sabah 2000—Malaysia. MMWR 2000; 49:816-7.
5. _____. Update: leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons-Illinois and Wisconsin. MMWR 1998;47:673-6.
6. _____. Outbreak of leptospirosis among white-water rafters-Costa Rica, 1996. MMWR 1997;46:577-9
7. Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. J Infect Dis 1998;178:1457-63.
8. Kupek E, De Sousa MC, Faverasani S. Relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991-1996. Braz J Infec Dis 2000;4:131-4.
9. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang E, Pruetz JD, McCoy AM, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: down regulation associated with late-log phase growth and mammalian infection. Infect Immun 1998;66:1579-87
10. Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. J Bacteriol 1992;174:4761-8.
11. Nyström T, Olsson RM, Kjelleberg S. Survival, stress resistance and alterations in protein expression in marine *Vibrio sp* strain S14 during starvation for different individual nutrients. Appl Environ Microbiol 1992;58:55-65.
12. Wai SN, Mizunoe Y, Yoshida S. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. FEMS Microbiol Lett 1999;180:123-31.
13. Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1998;180:1750-8.
14. Islam MS, Drasar BS, Sack B. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: A review. J Diarrhoeal Dis Res 1994;12:87-96.

Recibido: 17 de septiembre de 2001. Aprobado: 15 de noviembre de 2001.

Dr. *Gabriel Trueba*. Laboratorios de Microbiología. Universidad San Francisco de Quito, Vía Interoceánica, Círculo Cumbayá. Teléfonos 593 2 895-723 extensión 232 y 233.