

Evidencia de *Leptospira spp.* en musarañas *Cryptotis mayensis*. Nuevo hospedero en Yucatán, México

Alejandro Rafael Suárez-Galaz¹, Silvia Hernández-Betancourt², Jesús Alonso Panti-May¹, Pablo Manrique-Saide², Marco Torres-Castro^{1*}

¹Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán; ²Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán.

ABSTRACT

Evidence for *Leptospira spp.* in shrews *Cryptotis mayensis*. New host in Yucatan, Mexico.

Introduction. The pathogenic species of the *Leptospira* genus cause leptospirosis in susceptible humans and animals. Rodents are natural reservoirs of the bacteria; other wild animals are accidental hosts. Shrews have been involved in the transmission cycle of this pathogen in several countries; however, in Mexico, there is no information regarding this.

Objective. To describe the infection with *Leptospira spp.* in shrews captured in Yucatan, Mexico.

Material and methods. Two shrew specimens (*Cryptotis mayensis*) were captured in the municipality of Hunucma. Both were euthanized in order to collect samples from the kidney, spleen, and skeletal muscle for total DNA extraction. *Leptospira spp.* infection was screened by standard PCR for the amplification of a 16S ribosomal gene fragment (*16S rRNA*). Likewise, to verify and strengthen the results, other assays were carried out for the amplification of fragments corresponding to the *LipL32* and *rpoC* genes.

Results. In the DNA extraction from kidney tissue from one specimen, amplifications of the *16S rRNA* and *rpoC* genes were obtained.

Conclusion. This work represents the first report of *Leptospira spp.* infection in the renal tissue of *C. mayensis* from Yucatan, Mexico. More studies are needed in the region to determine the participation of these animals in the epidemiological cycle of this bacterial genus.

RESUMEN

Introducción. Las especies patógenas del género *Leptospira* ocasionan la leptospirosis en seres humanos y animales susceptibles. Los roedores son los reservorios naturales de estas bacterias; otros animales silvestres son hospederos accidentales. Las musarañas han sido involucradas en el

Historial del artículo

Recibido: 10 mar 2021

Aceptado: 27 ago 2021

Disponible en línea: 1 sep 2021

Palabras clave

Musarañas, infección, *Leptospira spp.*, hospedero, insectívoro, Yucatán

Keywords

Shrews, infection, *Leptospira spp.*, host, insectivore, Yucatan

Copyright © 2021 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Marco Antonio Torres-Castro, Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán. Avenida Itzáes, No. 490 x Calle 59, Col. Centro, C.P. 97000. Mérida, México.

E-mail: antonio.torres@correo.uady.mx

<http://revistabiomedica.mx>

ciclo de transmisión de este patógeno en varios países; sin embargo, en México, no existe información al respecto.

Objetivo. Describir la infección con *Leptospira spp.* en musarañas capturadas en Yucatán, México.

Material y métodos. Se capturaron dos ejemplares de musaraña (*Cryptotis mayensis*) en el municipio de Hunucmá. A ambos se les practicó la eutanasia para recolectar fragmentos de riñón, bazo y músculo esquelético que sirvieron para la extracción de ADN total. La infección con *Leptospira spp.* se exploró por PCR convencional para la amplificación de un fragmento del gen 16S ribosomal (*16S rRNA*). Asimismo, para corroborar y robustecer los resultados, se realizaron otras reacciones para la amplificación de fragmentos correspondientes a los genes *LipL32* y *rpoC*.

Resultados. En la extracción de ADN correspondiente al tejido renal de un ejemplar se obtuvieron los amplificados de los genes *16S rRNA* y *rpoC*.

Conclusión. Este trabajo representa el primer reporte de la infección con *Leptospira spp.* en tejido renal de *C. mayensis* de Yucatán, México. Es necesario realizar más estudios en la región para determinar la participación de estos animales en el ciclo epidemiológico del género bacteriano.

INTRODUCCIÓN

Leptospira es un género bacteriano cuyas especies que pertenecen al subgrupo patógeno ocasionan la leptospirosis en seres humanos y animales susceptibles. Esta zoonosis tiene tasas variables de prevalencia e incidencia en los diferentes estados con regiones de climas tropicales y subtropicales de México, entre ellos Yucatán (1).

Los animales silvestres infectados pueden ser fuente importante de infección para los seres humanos y animales domésticos, sobre todo para aquellos que están en contacto cercano y permanente, a través de la excreción de orina con bacterias viables que sobreviven en las condiciones propicias medioambientales (2). En animales silvestres de Yucatán existen reportes de la exposición a la infección con este género bacteriano, entre ellos roedores *Mus musculus*, *Rattus rattus* y *Heteromys gaumeri* (3), murciélagos *Artibeus*

jamaicensis, *Pteronotus parnellii* y *Chiroderma villosum* (4) y zarigüeyas *Didelphis virginiana* (5); sin embargo, las musarañas no han sido implicadas en el ciclo epidemiológico de *Leptospira spp.*

A nivel mundial, el conocimiento sobre la participación de las musarañas en el ciclo de transmisión, principalmente el que se presenta en ambientes silvestres, es insuficiente. No obstante, se ha especificado que estos animales pueden ser portadores accidentales de especies patógenas de leptospirosis (6). El objetivo del presente estudio es describir la infección con *Leptospira spp.* en musarañas capturadas en Yucatán, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como parte de un proyecto enfocado en la identificación de virus hemorrágicos en pequeños mamíferos de la península de Yucatán, México, se realizaron capturas de murciélagos y roedores silvestres en distintas localidades. En enero de 2019 se capturaron con trampas Sherman (7.5 cm x 23 cm x 9 cm, HB Sherman Traps Inc®; Estados Unidos de América [EUA]) dos ejemplares de musaraña en Hunucmá, Yucatán (21°02'44.6" N, 89°50'19.1" W; 21°04'49.3" N, 89°53'01.1" W).

La extracción de los animales fue aprobada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de México (acta: SGPA/DGVS/05995/19). La eutanasia y la recolección de muestras biológicas fueron aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) (acta: CB-CCBA-I-2018-001), Mérida, México.

Ambos individuos fueron trasladados a una estación de campo establecida en la localidad de captura para su anestesia y eutanasia con isoflurano y pentobarbital, respectivamente (7). Seguidamente, se realizó una necropsia para la recolección de fragmentos de riñón, bazo y músculo esquelético que fueron depositados en tubos estériles para microcentrífuga de 1.8 ml (Eppendorf®; Alemania) con alcohol al 96 %. Estos tejidos se usaron para la extracción de ADN total que se efectuó con el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN®; Alemania), previa digestión

con proteinasa K (Omega Bio-tek® Inc.; EUA). Las extracciones de ADN total fueron evaluadas en un Nanodrop® (Thermo Scientific®; EUA) para determinar su concentración y pureza.

Las pieles y cráneos de los ejemplares se depositaron en la Colección de Mastozoología de la FMVZ, UADY con las claves de registro CM-1405 y CM-1408.

La detección de *Leptospira* spp. se realizó por medio de PCR convencional, para lo cual primero se intentó la amplificación de un fragmento del gen 16S ribosomal (*16S rRNA*) y posteriormente, para confirmar y robustecer los resultados, con reacciones distintas se intentó la amplificación de fragmentos de los genes *rpoC* o *LipL32*. Todas estas reacciones fueron hechas por duplicado.

Tabla. Reactivos y condiciones de amplificación empleados para la detección de *Leptospira* spp. en los tejidos de *Cryptotis mayensis* capturadas.

Gen	Oligonucleótidos (5'→ 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Volumen de los reactivos*	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>16S rRNA</i>	F; 16S4F: GAACGGGATTAGATAACC R; 16S6R: CCTAGACATAAAGGCCATGA	440	2.5 µl PCR Buffer 1X 2.5 µl MgCl ₂ 0.5 µl dNTP's 0.5 µl de cada cebador	Desnaturalización inicial 95° C, 5 min. 35 ciclos: 1) 95° C, 30 segundos; 2) 58° C, 30 segundos; 3) 72° C, 30 segundos. Elongación final 72° C, 5 min.	4
<i>LipL32</i>	F; lipL32/270F: GCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT R; lipL32/692R: CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT	423	0.2 µl Taq ADN polimerasa** 13.30 µl agua ultra pura 5 µl ADN templado	Desnaturalización inicial 95° C, 5 min. 40 ciclos: 1) 95° C, 30 segundos; 2) 57° C, 15 segundos; 3) 72° C, 40 segundos. Elongación final a 72° C, 5 min.	8
<i>rpoC</i>	F; rpoCF: CAAGGGGTTTCATATCAACGATAA-3' R; rpoCR: GTTCCGGCAGGGATCATGTGACC-3'	353	2.5 µl PCR Buffer 1X 2.5 µl MgCl ₂ 0.5 µl dNTP's 1.0 µl de cada cebador 0.15 µl Taq ADN polimerasa** 12.35 µl agua ultra pura 5 µl ADN templado	Desnaturalización inicial 94° C, 5 min. 35 ciclos: 1) 94° C, 35 segundos; 2) 58° C, 45 segundos; 3) 72° C, 1 min. Elongación final 72° C, 5 min.	9

pb: pares de bases.

F: forward (sentido); R: reverse (antisentido).

*25 ul de volumen final; ** Fermentas®; EUA.

En la tabla se muestran las secuencias de oligonucleótidos, los tamaños de amplificados, volúmenes de los reactivos y las condiciones de amplificación para la detección de *Leptospira* spp. en los individuos estudiados. En todas las reacciones se utilizó como control positivo una extracción de ADN de *Leptospira* spp. tipificada como *L. borgpetersenii* y como control negativo una mezcla de todos los reactivos de la reacción correspondiente a excepción de la extracción de ADN. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf®; Alemania).

La electroforesis de los productos de las reacciones se realizó en geles de poliacrilamida al 8 % y se visualizaron en una pantalla de luz blanca. Los resultados se registraron con fotografías.

RESULTADOS

Se estudiaron dos ejemplares hembras de la especie *Cryptotis mayensis*. En uno se obtuvo el amplificado del gen *16S rRNA* en una extracción de ADN correspondiente al tejido renal, resultado que se validó con el amplificado del gen *rpoC* que se exhibe en la figura. Este ejemplar era una hembra adulta activa, es decir, durante su procesamiento se observó que presentaba la vagina abierta y en la necropsia se identificaron cicatrices e irregularidades en el cuello uterino.

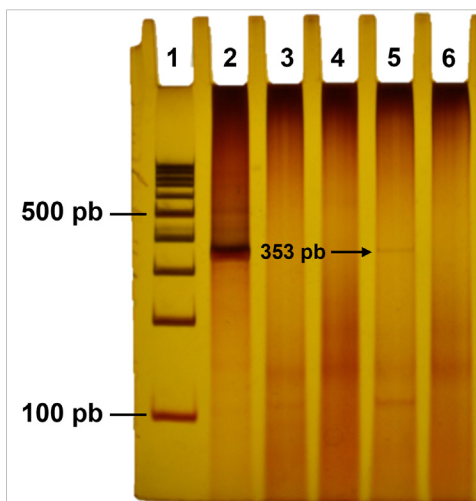


Figura. Gel de poliacrilamida al 8 % que muestra un amplificado de 353 pares de bases (pb) correspondiente al gen *rpoC* de *Leptospira spp.* Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carril 2: control positivo; carriles 3,4: muestras negativas (hígado y músculo esquelético); carril 5: muestra positiva (riñón); carril 6: control negativo.

DISCUSIÓN

Existen evidencias a nivel internacional, la mayor parte de ellas obtenidas con herramientas de diagnóstico molecular, de la intervención de varias especies de musarañas en el ciclo de transmisión de *Leptospira spp.* Algunos ejemplos son Mayer-Scholl *et al* (10) en Alemania, Nally *et al* (11) en Irlanda y Mgode *et al* (12) en Tanzania. A pesar de esto, hasta donde sabemos, este es el primer reporte de musarañas infectadas con *Leptospira spp.* en México.

Han sido escasamente explorados los factores que generan la infección con *Leptospira spp.* en musarañas capturadas en ambientes silvestres o

rurales. En este sentido, Mgode *et al* (12) señalan que estos animales suelen compartir el nicho ecológico con varias especies de roedores, lo cual es importante porque los roedores son los principales diseminadores de *Leptospira spp.* en el medioambiente (3). Particularmente, se ha descrito que *C. mayensis* convive con poblaciones de roedores silvestres como *H. gaumeri*, *M. musculus*, *Oryzomys melanotis*, *Ototylomys phyllotis*, *Otonyctomys hatti* y *Peromyscus yucatanicus* (13). En Yucatán, se ha descrito la infección con leptospirosis patógenas en *H. gaumeri*, *M. musculus* y *R. rattus* (3), por lo que es factible que la interacción entre estas especies y el uso común de espacios contaminados con leptospirosis excretadas por la orina de los roedores mencionados, generen la transmisión entre las poblaciones (14).

Aunque especulativo, otro factor que pudo influir en la infección con *Leptospira spp.* en una de las musarañas estudiadas, es el consumo de insectos con restos de sustrato (contaminado con bacterias viables) en sus extremidades. Este mecanismo de transmisión ha sido propuesto en otros animales insectívoros capturados en Yucatán (4).

Por otro lado, se ha informado que las musarañas son capaces de excretar leptospirosis patógenas por la orina y contaminar el medioambiente (6), lo cual cobra relevancia por la identificación de ADN de *Leptospira spp.* en el tejido renal de un individuo estudiado, y aunque aún no se ha establecido la conexión entre la circulación de musarañas infectadas y la presencia de casos de leptospirosis humana, Widiastuti *et al* (15) han sugerido esta probabilidad.

Una limitante de este trabajo, además del número reducido de individuos estudiados, es que no se determinó la especie infectante. En este contexto, es relevante indicar que la reacción molecular empleada (*rpoC*) para corroborar los resultados tiene un valor alto de sensibilidad, logrando detectar hasta 35 especies de *Leptospira spp.*, entre ellas las patógenas e intermedias que ocasionan la leptospirosis (9).

Nuestro hallazgo, resalta la importancia de estudiar a los pequeños mamíferos o micromamíferos de Yucatán para determinar y/o disminuir el riesgo de transmisión de microorganismos zoonóticos a los

seres humanos y animales domésticos susceptibles, sobre todo en las comunidades rurales (11).

CONCLUSIÓN

Se presenta la primera detección molecular de *Leptospira* spp. en tejido renal de una musaraña (*C. mayensis*) de Yucatán, lo cual establece que estos animales son hospederos del agente patógeno. Son necesarios más estudios para determinar las especies de leptospirosis asociadas a estos mamíferos y para comprender mejor su participación en el ciclo epidemiológico de este género bacteriano.

AGRADECIMIENTOS

A los estudiantes involucrados en la captura y procesamiento de los animales. El trabajo de campo fue financiado por el proyecto “Análisis y evaluación de los probables vectores y reservorios del virus del Ébola en México”, CONACYT-251053, apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación.

REFERENCIAS

- Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Agudelo-Flórez P, Arroyave-Sierra E, Zavala-Castro J, Puerto FI. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016 Sep-Oct; 54(5): 620-5. <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
- Victoriano AF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect Dis. 2009 Sep; 9: 147. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-147>.
- Torres-Castro M, Cruz-Camargo B, Medina-Pinto R, Reyes-Hernández B, Moguel-Lehmer C, Medina R, et al. Detección molecular de leptospirosis patógenas en roedores sinantrópicos y silvestres capturados en Yucatán, México. Biomedica. 2018 Aug; 38(S2): 51-8. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3938>.
- Torres-Castro M, Febles-Solís V, Hernández-Betancourt S, Noh-Pech H, Estrella E, Peláez-Sánchez R, et al. *Leptospira* patógenas en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. Rev MVZ Córdoba. 2020 May-Aug; 25(2): e1815. <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.1815>
- Ruiz-Piña HA, Puc-Franco MA, Flores-Abuxapqui J, Vado-Solis I, Cardenas-Marrufo MF. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002 Jul-Aug; 44(4): 235-7. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652002000400011>
- Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, et al. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. Int J Environ Res Public Health. 2014 Jul; 11(8): 7562-74. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110807562>
- Sikes RS; Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. J Mammal. 2016 Jun; 97(3): 663-88. <http://dx.doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>
- Chávez Á, Somarriba BF, Soto A, Sheleby-Eliás J, Duttmann C, Jiménez E, et al. Detección de *Leptospira* spp. en animales y muestras ambientales de áreas peridomésticas en Nicaragua. Rev Panam Salud Publica. 2018 Mar; 42: e26. <http://dx.doi.org/10.26633/RPSP.2018.26>
- Julio RGV, Agudelo-Flórez P, López JÁ, Sánchez RGP. New molecular target for the phylogenetic identification of *Leptospira* species directly from clinical samples: an alternative gene to 16S rRNA. Rev Soc Bras Med Trop. 2020 Mar; 53: e20190333. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0333-2019>
- Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, et al. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. Int J Environ Res Public Health. 2014 Jul; 11(8): 7562-74. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110807562>
- Nally JE, Arent Z, Bayles DO, Hornsby RL, Gilmore C, Regan S, et al. Emerging infectious disease implications of invasive mammalian species: the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) is associated with a novel serovar of pathogenic *Leptospira* in Ireland. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Dec; 10(12): e0005174. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005174>
- Mgode GF, Katakweba AS, Mhamphi GG, Fwalo F, Bahari M, Mdangi M, et al. Prevalence of leptospirosis and toxoplasmosis: a study of rodents and shrews in cultivated and fallow land, Morogoro rural district, Tanzania. Tanzania J Hlth Res. 2014 Jul; 16(3): e11. <http://dx.doi.org/10.4314/thrb.v16i3.11>
- Ceballos G. Mammals of México. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2014.
- Valbuena-Torrealba C, Péfaur-Vega JE. Determinación de leptospirosis en roedores y marsupiales de la región Sur del Lago de Maracaibo, estado Mérida, Venezuela. Rev Científica. 2015 May-Jun; XXV(3): 193-9. <http://www.redalyc.org/pdf/959/95939206002.pdf>
- Widiastuti D, Sholichah Z, Agustiningih, Wijayanti N. Identification of pathogenic *Leptospira* in rat and shrew populations using rpoB gene and its spatial distribution in Boyolali District. Kesmas: National Public Health Journal. 2016 Aug; 11(1): 32-8. <http://dx.doi.org/10.21109/kesmas.v11i1.798>