



## RESERVORIO ANIMAL Y DIFUSIÓN AMBIENTAL DE CEPAS DE LEPTOSPIRA.

*Elba Hernández<sup>1</sup>, Paulina Meny<sup>1</sup>, Cristina Ríos<sup>2</sup>, Gustavo Varela<sup>1</sup>, Gustavo Sarroca<sup>1</sup>, Milton Cattaneo<sup>2</sup>, Martín Breijo<sup>1</sup>, Pablo Alonzo<sup>2</sup>, Mario Clara<sup>4</sup>, Fernando Dutra<sup>3</sup>, Rodolfo Rivero<sup>3</sup>, Helena Katz<sup>2</sup>, Felipe Schelotto<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, UdelaR; <sup>2</sup> Facultad de Veterinaria, UdelaR; <sup>3</sup> Dirección de Laboratorios Veterinarios, MGAP; <sup>4</sup> Centro Universitario de Rivera, UdelaR, Respaldo: Laboratorios Santa Elena y Fundación Manuel Pérez

### RESUMEN

El control de la leptospirosis animal y humana requiere el desarrollo de vacunas efectivas, basadas en componentes relevantes de las cepas microbianas prevalentes en el país y la región. Con este fin, hemos avanzado en la recuperación y análisis de cultivos procedentes de vacunos, roedores, personas y ambiente, y en su identificación mediante técnicas (MVLA-VNTR) de examen de su ADN.

### SUMMARY

Animal and human leptospirosis control requires the development of effective vaccines, based on relevant molecular components of prevalent microbial strains in Uruguay and its neighbouring region. For this purpose, we have worked on recovering and studying cultures of bovine, rodent, human and environmental origin, and initially identified them through MVLA-VNTR pcr procedures of DNA analysis.

### INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de amplia difusión mundial, que afecta al hombre y a múltiples especies animales. Es causada por cepas patogénicas del género *Leptospira*, compuestas por bacterias Gram negativas largas, espiraladas que no pueden ser fácilmente estudiadas por métodos convencionales. Son gérmenes de lento crecimiento y temperatura óptima próxima a 28°C, que no forman colonias aislables en medios sólidos, que en medios líquidos resultan vulnerables al sobre-crecimiento por otras bacterias, y que por su calibre muy estrecho sólo pueden ser visualizadas con campo oscuro, inmunofluorescencia u otras técnicas especiales.

Los estudios de DNA del género, han identificado 20 genoespecies, 14 de ellas con cepas plena o parcialmente patógenas. Los antígenos LPS de membrana externa definen unos 280 serovares, organizados por similitudes antigénicas en 24

serogrupos.

Los riñones de los mamíferos de producción, de compañía o silvestres, como los roedores infectados, constituyen el reservorio de *Leptospira*. La leptospirosis en bovinos (1) está asociada principalmente a trastornos reproductivos que suelen producirse tras 1 a 3 semanas de comenzada la enfermedad: abortos (usualmente del último trimestre), mortinatos, reabsorción embrionaria, nacimiento de animales débiles, retención de placenta, infertilidad, agalactia o reducción de producción láctea. Las tormentas de abortos preocupan en especial a productores de leche o carne bovina, y reflejan la alta frecuencia de infección en esta especie, que genera importantes pérdidas económicas.

La infección humana es especialmente frecuente entre los trabajadores de tambos y otros en contacto con rumiantes de producción (2), por lo que resulta importante desarrollar procedimientos de prevención y vacunas aplicables a la prevención en población de riesgo humana y animal, especialmente bovina. Sin embargo, el estudio de la infección animal o humana se ha concentrado por décadas en los métodos serológicos, limitando la información directa sobre los gérmenes circulantes, sus variantes y sus características moleculares, datos relevantes para avanzar en el desarrollo de vacunas efectivas.

Objetivos. El eje de orientación del trabajo consistió en la recuperación y caracterización de las bacterias del género *Leptospira* que constituyen el reservorio de infección animal y humana. Los objetivos específicos fueron: 1- Estudiar la frecuencia y distribución de la infección por *Leptospira* en animales de diversas especies (bovinos, roedores y otros) vinculados a los brotes de infección humana, y de la contaminación de fuentes ambientales de agua asociadas; 2- Identificar y caracterizar a nivel específico y subespecífico las cepas involucradas; 3- Comparar a nivel molecular los aislamientos de distintos orígenes, para orientar la contención de la transmisión y la composición deseable de los preparados inmunizantes.



**MATERIALES Y MÉTODOS**

A partir de junio de 2013, se obtuvieron las siguientes muestras de diferentes especies animales y posibles fuentes de infección: 1) riñones bovinos en planta de faena, de diferentes categorías (vacas, novillos) y de todos los departamentos del país (n= 118); en la distribución de los animales de origen de estos riñones se buscó reproducir la diversidad geográfica, genética y de manejo de la población bovina nacional, procurando una muestra representativa de la misma; 2) hígado, sangre, riñones y/u orina de terneros muertos con diagnóstico presuntivo de infección por *Leptospira* (n= 6); 3) riñones de diferentes especies de roedores capturadas a campo: ratones (*Scapteromys tumidus*) (n= 14), apereá (*Cavia aperea*) (n= 2) y ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) (n= 4); 4) aguas próximas a focos de infección (charcas, bebederos, pozos de agua) de zonas rurales, urbanas y silvestres (zoológicos, isla de Lobos) (n= 14). Se practicó cultivo de todas las muestras en caldo EMJH y en Fletcher semisólido, siguiendo procedimiento empleado en INTA Castelar (3), se realizó en todas ellas ensayo de inmunofluorescencia directa (4) con suero policlonal de conejo que contiene anticuerpos contra antígenos de los principales serovares regionales anti-leptospira, conjugados con FITC, y se ensayó (en algunas hasta el momento) real time qPCR para detección de las secuencias genéricas del germen, y de las que identifican sus variantes patogénicas o no patogénicas. La concentración y purificación de los cultivos requirió filtrados por membrana de poro 0,2, subcultivos con neomicina, o inoculación intraperitoneal en hamsters, con subcultivos de sangre cardíaca en 1, 2 y 8 horas, y/o siembra de tejido renal al cabo de 20 días.

La identificación de los cultivos positivos, y de los hemocultivos humanos que llegan de modo rutinario a nuestro laboratorio, se hizo como primer paso mediante Análisis de Múltiples Locus de elementos repetitivos en tandem con número Variable (MLVA, 5). Se utilizaron pares de cebadores que flanquean distintos VNTR menores de 100pb, y se examinaron por electroforesis los polimorfismos obtenidos por amplificación de estas secuencias. Esta técnica permite discriminar serovares y es altamente reproducible.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En todos los tipos de muestra se obtuvieron resultados positivos, en general coincidentes por cultivo e IF directa. Los cultivos positivos fueron

excepcionalmente puros en primera instancia, y habitualmente mostraron flora mixta que exigió procedimientos adicionales de concentración y separación. La detección del cultivo positivo requirió observación periódica reiterada, con muchos resultados de sospecha o confirmación tardía, al cabo de 4, 6 o más meses.

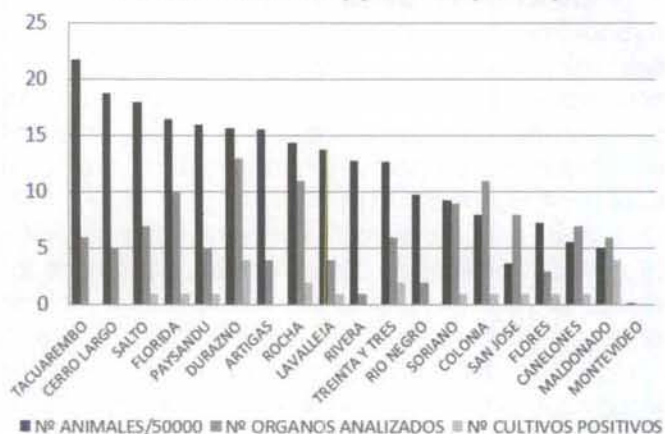
Contamos al momento de esta comunicación preliminar con más de 30 cultivos en estudio, de los cuales se ha concluido la identificación de 2 cepas de origen humano: una de serovar Pomona y otra Wolffi. Los diagnósticos presuntivos de terneros infectados se han confirmado en general con cultivos e IF positiva; los riñones de las distintas especies de roedores muestran cultivos positivos, y los cultivos de riñones bovinos de faena han resultado positivos en 18% de los casos aproximadamente, cifra que casi duplica la prevalencia de infección presente esperada como hipótesis. Ello revela la magnitud del problema en términos productivos y económicos, muestra la amplia exposición de los trabajadores en contacto con el reservorio animal, y podría explicar la frecuencia de infección en los mismos. Los datos obtenidos hasta el momento, que se presentan parcialmente en gráfico y tabla adjuntas, no muestran una concentración significativa de la infección en zona geográfica, género, raza o tipo de explotación y manejo de los bovinos analizados (ganadera o lechera, extensiva o intensiva, vacas o novillos). Es probable que la especial frecuencia de infección de trabajadores de tambos y predios de trabajo intensivo esté más asociada al tipo de vinculación humano-animal que a la intensidad o frecuencia de la infección bovina.

	Nº en país	% en país	Nº en muestra	% en muestra	pos en muestra	% pos/muestra
Vacas	4.354.458	38,2	70	59,3	11	9,3
Novillos	2.099.048	18,4	44	37,3	10	8,5
Otros	2.004.085	17,6	4	3,4	0	0,0
TOTAL	8.457.591	74,1	118	100	21	17,8

**Tabla 1.** Porciento de muestras de riñones obtenidas de distintos tipos de bovinos, y % de positivas.



Riñones analizados y positivos por Depto.



■ Nº ANIMALES/50000 ■ Nº ORGANOS ANALIZADOS ■ Nº CULTIVOS POSITIVOS

## BIBLIOGRAFÍA

- Dutra F. Epidemiología y control de la leptospirosis bovina en el Uruguay, con especial referencia en la zona Este. Boletín de la 1ª jornada conjunta Academia Nacional de Veterinaria+Academia Nacional de Medicina. UdelaR, setiembre 2013.
- Schelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, Pardo L, Parada D, Filippini M, Balseiro V, Geymonat JP, Varela G. A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. Rev. Inst. Med. Trop São Paulo 54: 69-75, 2012.

- Brihuega B, Rossetti C, Romero G, Auteri C. Manual del Curso Teórico-Práctico de Leptospirosis animal. Laboratorio de Leptospirosis, Instituto de Patobiología, INTA Castelar, Argentina. Junio 2010.
- Chagas-Junior AD, da Silva CL, Soares LM, Santos CS, Silva CD, Athanazio DA, dos Reis MG, McBride FW, McBride AJ. Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR. PLoS One. 2012; 7(2): e32712.
- Pavan ME, Cairó F, Petinari MJ, Samartino L, Brihuega B. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 34: 135-141, 2011.