

Estudio seroepidemiológico molecular de leptospirosis en establecimientos porcinos y producciones de traspatio; su importancia en el control de la enfermedad

Molecular seroepidemiological study of leptospirosis in pig farms and backyard production; its importance in the control of the disease.

Investigadores USAL:

Brihuega, Bibiana (bibiana.brihuega@usal.edu.ar), Samartino, Luis;
Arregui, Matías

Alumnas USAL:

Falabella, Fátima María; Cadenas, Rosario

Palabras clave: leptospirosis, ambiente, porcinos, diagnóstico, zoonosis

Keywords: *Leptospira*, environment, swine, diagnosis, zoonosis

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a todos los animales de producción. Es la enfermedad transmisible al hombre de mayor difusión. Los porcinos que se contagian con leptospirosis sufren abortos y problemas reproductivos. El objetivo de la investigación de *Leptospira* spp, causante de esta zoonosis, fue conocer qué cepas circulan en la provincia de Buenos Aires en las poblaciones porcinas. Las herramientas utilizadas para la investigación fueron la técnica serológica de microaglutinación, MAT, frente a 23 serogrupos; siembras en medio EMJH y medio Staff, y detección con técnicas PCR.

El 41 % de los sueros testeados resultó positivo a *Leptospira* spp con la técnica de microaglutinación, MAT. Se aisló en medio EMJH una cepa genotipificada con perfil Pomona Pomona.

Se logró la primera detección en Argentina del serovar *Leptospira Bratislava Jez Bratislava* en el partido de Cañuelas.

Estos resultados demuestran nuevas leptospirosis circulantes, las cuales deberían ser incorporadas a las vacunas contra leptospirosis en los porcinos, dado que las vacunas son serovar dependientes.

Abstract

*Leptospirosis is an infectious disease that affects all production animals. It is the most widespread disease transmissible to humans. Swine infected with leptospirosis suffer abortions and reproductive problems. The objective of the research on *Leptospira* spp, the cause of this zoonosis, has been to know which strains circulate in the province of Buenos Aires in swine populations. The tools used for the investigation were the serological technique of microagglutination, TMA against 23 serogroups; sowings in EMJH and Staffmedia and detection with PCR techniques.*

*Forty-one percent of the sera tested were positive for *Leptospira* spp with the microagglutination technique, MAT. A genotyped strain with Pomona Pomona profile was isolated in EMJH medium.*

*The first detection of serovar *Leptospira Bratislava Jez Bratislava* in Argentina was achieved in the district of Cañuelas.*

These results demonstrate new circulating leptospire, which should be incorporated into vaccines against leptospirosis in swine, since vaccines are serovar dependent.

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis endémica transmitida por animales de producción y animales silvestres a través de la orina, principalmente, que contamina el medio ambiente. Las leptospiras son bacterias que sobreviven 180 días en el barro y 365 días en el agua, por lo que la difusión es amplia, pudiendo tomar contacto con el hombre y otros animales. Los porcinos, roedores y caninos son los mayores eliminadores de leptospiras por orina.

En la actualidad, existen 21 especies de *Leptospira* spp., diferenciadas por análisis filogenéticos agrupadas en tres clúster: especies patógenas (9), intermedias (5) y no patógenas (7) (Levett, 2018). El ciclo epidemiológico de esta zoonosis es complejo, ya que interactúan varias especies que conviven en biocenosis.

Leptospira entra al animal a través de pequeños cortes o abrasiones, a través de membranas mucosas como la conjuntiva o la piel húmeda (Scialfa *et al*, 2013). Uno o dos días tras la infección, hay una fase de leptospiremia que dura de cuatro a siete días. Durante este período, las bacterias se multiplican en muchos tejidos, incluido el hígado, los riñones, el aparato reproductor, los ojos y el sistema nervioso central. Cuando la carga bacteriana en sangre y tejidos llega a un nivel crítico aparecen las lesiones por la acción de toxinas de leptospira o por componentes tóxicos celulares, y a continuación se observan los síntomas. Esta fase de infección normalmente pasa desapercibida en animales adultos. En infecciones experimentales o durante la infección en un establecimiento no expuesto anteriormente, muchos cerdos pueden presentar anorexia, fiebre y conjuntivitis leve. Sin embargo, en establecimientos infectados endémicamente no suele detectarse. La lesión primaria es el daño en el endotelio de pequeños vasos sanguíneos e isquemia localizada en los órganos, lo que da lugar a necrosis tubular renal y daño hepatocelular.

En algunos portadores crónicos, las lesiones macroscópicas consisten en nefritis intersticial, normalmente llamada “de manchas blancas” (áreas irregulares blanquecinas en el riñón, de hasta 1 cm de diámetro), y que puede observarse al sacrificio. En el útero de cerdas gestantes la infección de los fetos tiene lugar cuando leptospira atraviesa la barrera placentaria, algo que solo se presenta durante el período limitado de leptospiremia de la madre (Faine, 1999). Así, la mayoría de los fetos de una camada se infecta a partir de mitad de gestación, y tienen lugar abortos y nacimientos de mortinatos o lechones débiles. La posibilidad de infección transplacentaria se reduce en el primer mes de la gestación y las consecuencias, en este caso, serían la muerte embrionaria y la reabsorción, con un retorno regular o irregular al celo, o la reducción del tamaño de camada con o sin la presencia de momificados.

Se estima que 3 a 6 % de los abortos porcinos en un hato endémico pueden ser provocados por leptospirosis. La leptospirosis en porcinos es alta. En Argentina, se logró aislar e identificar en brotes con abortos la serovariedad Pomona (Brihuega *et al*, 1996) con presencia de natimortos y disminución de crías. También se aisló del medio ambiente la serovariedad Icterohaemorrhagiae, del Río Reconquista, provincia de Buenos Aires, que aguas arriba bordea numerosos criaderos de porcinos y recorre grandes zonas urbanizadas (Rossetti *et al.*, 2002; Brihuega *et al.*, 2006).

Esta enfermedad produce importantes pérdidas económicas para el sector pecuario. La infección del cerdo por parte de serovares propios de otras especies animales, serovares no adaptados, desencadena un cuadro clínico agudo caracterizado por estados febriles, anorexia, diarrea, hipoagalaxia en cerdas lactantes, cierta ictericia y hemoglobinuria, y un violento cuadro de fallo reproductivo que cursa con tormentas de abortos, aumento de las repeticiones, aparición de cerdas sucias, mortinatos, momias y mortalidad perinatal. Por otro lado, el cuadro clínico ocasionado por la infección por los serovares adaptados al cerdo puede presentarse de igual manera, pero en general de forma menos virulenta. En cuanto a los estudios serológicos argentinos, los serovares patógenos hallados hasta el momento en porcinos, son Pomona cepa Pomona e Icterohaemorrhagiae (AAVLD, 2017).

En Argentina no se conoce la seroprevalencia del serovar Bratislava, adaptado a la especie porcina, ni su relevancia en esta producción; tampoco se conoce la seroprevalencia actual de los serovares no adaptados a la especie porcina. En 2012, se halló una seroreactividad frente a uno o más serovares de *L. interrogans* del 35 % en los porcinos estudiados.

Estudios realizados en SENASA han encontrado animales seroreactivos en un 30 % en la provincia de Buenos Aires. La misma tendencia se observa en todas las provincias de nuestro país (Petrakovsky *et al.*, 2013). En 2015, se halló una tasa de seropositividad de 33,93 %.

Es por esto que la población porcina tiene importancia en la diseminación de la enfermedad, ocurriendo la infección por contacto con cerdos infectados portadores, por ambiente contaminado o por un portador alterno (Brihuega *et al.*, 2017). Se requieren bajas dosis para infectar un animal y esto ayuda a que se alcance alta prevalencia.

En los diagnósticos de rutina, no se testean todas las serovariedades de *Leptospira* spp, y conocer qué cepas circulan en el medio es importante para poder controlarla a través de inmunógenos. Es por ello que se propuso el estudio de las cepas patógenas de *Leptospira* spp circulantes en Argentina que afectan la producción porcina con el fin de aumentar el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, siendo esta la base de la prevención y control de la infección en el hombre y en los animales.

Metodología

Se procesó el material biológico mediante técnicas serológicas, moleculares y bacteriológicas.

Se procesaron 1500 muestras de sueros porcinos procedentes de los dos partidos de la provincia de Buenos Aires —La Plata y Cañuelas—, donde se concentran numerosos establecimientos porcinos y cría de porcinos en traspatio.

Los sueros fueron enfrentados a la técnica serológica de referencia internacional (OMSA-fundada como OIE) de microaglutinación (MAT). Los sueros porcinos se testearon con las 8 cepas referenciales usadas habitualmente en el diagnóstico de rutina: serovares: Pomona, Pomona; Copenhageni, M 20; Tarassovi, Perepelicin; Wolffi, 3705, Ballum Castellonis, Castellon 3; Canicola, Hond Utrecht IV; Grippotyphosa, Moskva V y Hardjo Hardjoprajitno; y se incorporaron a esta investigación los restantes serogrupos de *Leptospira* spp existentes, clasificados taxonómicamente por el Comité de la Internacional Leptospirosis Society, I.L.S (Australis Bratislava Jez Bratislava, Bataviae Bataviae Van Tienen, Hebdomadis Hebdomadis, Pyrogenes Salinem, Manhao Manhao3, Hurstbrigge BUT 6, Autumnalis Autumnalis, Cynopteri Cynopteri, Semarang Semarang, Javanica Veldrat Bat 46, Sejroe M 84, Celledoni Celledoni, Panama CZ 214 K, Mini Giorgia, Ranarum Pingchang), para testear qué serovares circulan por la población porcina actualmente, tanto en establecimientos como en producciones de trastienda.

Las cepas de referencia son procedentes del Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda, recibidas en el Laboratorio de Leptospirosis, Referencia OMSA (Organización Mundial de Salud Animal), fundada por OIE, INTA Castelar.

Para la ejecución de la técnica de microaglutinación, MAT, el suero sanguíneo fue la muestra de elección. Se solicitaron muestras pareadas, con una diferencia de 10- 12 días. Se establecieron las diluciones de partida (Puntos de corte) según las muestras o la especie animal en estudio. Suero sanguíneo porcinos: 1/100 dilución inicial.

Se investigó la presencia de serovares no buscados habitualmente en porcinos que puedan afectar la producción y que puedan significar un riesgo como zoonosis.

Para el diagnóstico molecular y bacteriológico, se tomaron 292 muestras de orina para hacer PCR y siembra, tratando de detectar leptospirosis.

Las muestras se sembraron en medios especiales, EMJH y Staff. Se llevaron a estufa de 28 °C, y se observaron semanalmente bajo microscopía de campo oscuro a 160 X.

Para el diagnóstico molecular, se extrajo el ADN usando el protocolo de resina de Chelex-10011 y se sometió a una PCR de punto final dirigida al gen secY, usando los cebadores G1/02 (Brihuega *et al.*, 2016).

Se utilizó la técnica Multiple Locus Variable Análisis (MLVA) para realizar las genotipificaciones (Pavan *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2011a). El análisis de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA) utiliza los locus VNTR (repeticiones en tándem de número variable) para tipificar las serovariedades presentes en las diferentes especies de *Leptospira*. Un análisis de la base de datos de repeticiones en tándem mostró que el genoma de *L. interrogans* presenta muchas secuencias repetitivas de menos de 100 (cien) pb de longitud. Estas repeticiones son altamente útiles para analizar los polimorfismos basados en la electroforesis de los productos de PCR obtenidos. El MLVA puede discriminar entre serovares (Pavan *et al.*, 2011b).

A partir de estos estudios podrá concluirse si deben incorporarse más cepas para enfrentar los sueros porcinos al diagnóstico serológico MAT, Técnica de Microaglutinación; y si los inmunógenos disponibles en el mercado protegen a toda la población porcina y, por ende, a la salud pública.

Resultados

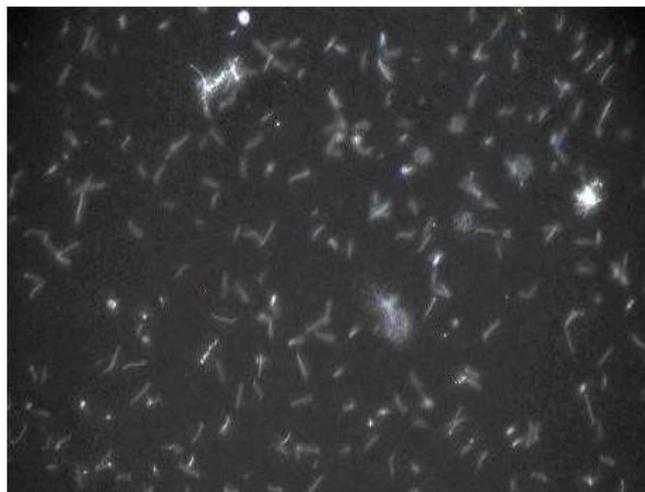
El 41 % de los sueros testeados resultó positivo a *Leptospira* spp con la técnica de microaglutinación, MAT. Se detectaron las siguientes serovariedades en el partido de La Plata: Pomona (91.8 %), Icterohaemorrhagiae (9.3 %), Grippotyphosa (14.2 %), Castellonis (11 %), Tarassovi (4.0 %), Canicola (1.6 %).

Y en el partido de Cañuelas: Pomona (81 %), Icterohaemorrhagiae (9.1 %), Grippotyphosa (15.7 %), Wolffi 3705 (3.0 %) y, por primera vez, hubo sueros positivos a Bratislava (4.0 %) (ver la Figura 1).

Se logró la primera detección del serovar *Leptospira* Bratislava Jez Bratislava en Argentina, en el partido de Cañuelas, mediante MAT.

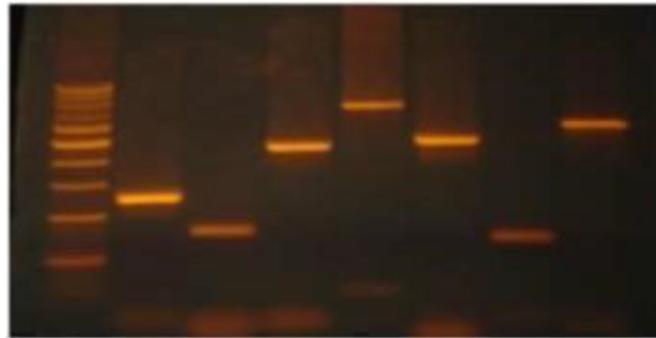
Figura 1

MAT. Suero positivo. Serovar Bratislava



Se procesaron 292 muestras de orina por PCR, detectándose leptospiras en seis orinas. Se detectaron 3 serovares Pomona en el partido de la Plata y 2 serovares Pomona en el partido de Cañuelas, mediante PCR.

Se logró aislar en medio EMJH una cepa genotipificada con perfil Pomona Pomona (ver la Figura 2).

Figura 2Perfil *Leptospira interrogans* Pomona Pomona

Teniendo en cuenta los datos de la anamnesis, se observó que los sueros positivos a la serovariedad Pomona presentaron abortos, y los positivos a la serovariedad Bratislava se asociaron a casos con natimortos.

El estudio seroepidemiológico molecular en establecimientos porcinos nos permitió saber qué porcentaje de animales eran potencialmente diseminadores, y confirmar la presencia de Bratislava, aportando así conocimiento para el control de esta zoonosis.

Discusión

Hay poco conocimiento sobre la leptospirosis porcina en nuestro país, sobre serovariedades circulantes, epidemiología y herramientas de control.

En el marco del proyecto de investigación de leptospirosis porcina, se realizó por primera vez un estudio amplio, incorporando las 23 serovariedades en el testeo con la técnica de microaglutinación (MAT), y detección en orina de leptospirosis mediante PC para conocer el cuadro de situación de la leptospirosis porcina en partidos de la provincia de Buenos Aires con gran concentración de porcinos y altamente poblados.

En ocasiones, la infección de *Leptospira* spp en cerdos es subclínica, especialmente en regiones endémicas, pero puede causar enfermedad grave según la serovariedad infectante y la edad de los animales. Así, se han descrito cuadros clínicos caracterizados por meningitis, ictericia y hemoglobinuria en lechones de menos de tres meses por la infección con serovariedades accidentales o no adaptadas, principalmente Canicola, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa. Muchos de estos lechones se recuperan en menos de una semana sin necesidad de tratamiento, pero otros pueden morir. Además, puede observarse infertilidad con retomo al celo regular o irregular, a veces acompañado de descargas vulvares y natimortos, en el caso de serovariedades del serogrupo Australis, especialmente por Bratislava. Siendo los cerdos reservorios de las serovariedades Bratislava, Pomona y Tarassovi (Francisco Javier García Peña, Laboratorio Central de Madrid, XII Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospiriosis; ILS 2019, Vancouver, Canadá). La serovariedad Bratislava puede estar implicada en brotes de infertilidad importantes.

De estas serovariedades, solo la Bratislava tiene una distribución mundial. Pomona, tradicionalmente asociada a los cerdos, ha sido la serovariedad causante de brotes clínicos en el Norte y Sudamérica, algunos países asiáticos, Australia y Europa del este, pero es poco frecuente en países al oeste de Italia. Finalmente, la serovariedad Tarassovi se describe generalmente en Australia, Nueva Zelanda y Europa del Este, pero es rara en países de Europa occidental.

Es necesario conocer las serovariedades involucradas actualmente en la población porcina, saber qué cepas están circulando, para incorporar serovariedades a las técnicas diagnósticas y así poder testear anticuerpos de otras serovariedades circulantes que hoy no llegan a detectarse y que son problemas sanitarios en otros países.

En este estudio se confirmó la presencia, por primera vez en Argentina, de la serovariedad Bratislava en la población porcina bonaerense.

Estos resultados demuestran nuevas leptospiras circulantes, las cuales deberían ser incorporadas a las vacunas contra leptospirosis en los porcinos, dado que las vacunas son serovar dependientes.

Referencias

- AAVLD (2017). *Informe Sobre Leptospirosis* (Comisión Científica Permanente de Leptospirosis, AAVLD, 2017). <http://www.aavld.org.ar/documentos/6->
- Brihuega, B. y col. (1996). Prevalencia de leptospirosis en porcinos. *Rev Med Therios*. 132, pp. 300-305.
- Brihuega, B.; Auteri, C.; Romero, G. y Samartino, L. (2006). Aislamiento de una cepa patógena de leptospira de un río urbano: Respuesta frente a quinolonas fluoradas. *Rev Med Vet*. 87/4, pp. 144-146.
- Brihuega, B. y Grune Loffier, S. (2016) *Boletín Sanitario*. Novedades del Programa de Salud Animal, Página INTA. PCR para detectar leptospiras patógenas en muestras clínicas animales 12/16, pp. 15-17.
- Brihuega, B.; Samartino, L.; Romero, G.; Auteri, C.; Martínez y M.; Grune, S. (2017). First isolation of *Leptospira borgpetersenii* from fetuses of wild boars (*Sus scrofa*). *Rev Electronic Journal of Biology*. 13/1, pp. 63-66.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C. y Perolat, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. Second Edition Melbourne, Australia. *MediSci*.
- Levett, P. N. y Picardeau, M. (2018). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Leptospiraceae. Minutes of the closed meeting, Palmerston North, New Zealand. *Int J Syst Evo! Microbio!* 68/10, pp. 3362.
- Pavan, M. E.; Cairo, F.; Brihuega, B. y Samartino, L. (2008). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comp. Immunol. Microbio/. Infect. Dis*. 31, pp. 37-45
- Pavan, M. E.; Brihuega, B.; Pettinari, M. J. y Cairó, F. (2011a). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 43, pp. 251-255
- Pavan, M. E.; Cairo, F.; Pettinari, J.; Samartino, L. y Brihuega, B. (2011b). Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comp. Immunol. Microbio/. Infect. Dis*. 34, pp. 135- 141
- Petrakovsky *et al.* (2013). Leptospirosis porcina: prevalencia serológica en establecimientos productores de la República Argentina. *Revista MVZ Córdoba* 1811, pp. 3282
- Rossetti, C.; Brihuega, B.; Auteri, C. y Romero, G. (2002). Leptospirosis porcina en la República Argentina: Encuesta serológica y primera comunicación del aislamiento de una cepa de *Leptospira interrogans* (sg. *Icterohaemorrhagiae*) de una cerda abortada. *Rev Vet.Arg.*17/168, pp. 578-582.
- Scialfa, E.; Brihuega, B.; Recavarren, M. y col. (2013). Circulación de leptospiras patógenas en áreas periurbanas y rurales del centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Raz y Eie*. 8/13, pp. 17-23.