

ARTÍCULO ORIGINAL

DetECCIÓN DE *Leptospira* spp. (Spirochaetales: Leptospiraceae) EN MUESTRAS AMBIENTALES DE REGIONES HABITADAS POR POBLACIONES VULNERABLES DEL NORTE ARGENTINO

Grune Loffler S^{1,2,*}, Periago MV^{2,3}, Watanabe O¹, Saraullo V¹, Aldama E³, Cejas RG³, Cruz D³, Delgado C³, Goizueta C³, Hamer M¹, Martínez M¹, Brihuega BF¹

1. Laboratorio de Leptospirosis, Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.
3. Fundación Mundo Sano, Argentina.

* Correspondencia: Sylvia Grune Loffler. Instituto de Patobiología (CICVyA) INTA-Castelar, Laboratorio de Leptospirosis, Nicolás Repetto y De Los Reseros s/n, CP 1686, Buenos Aires, Argentina.
E-mail: grune.sylvia@inta.gob.ar

Recibido: 5 Marzo 2021. Aceptado: 26 Agosto 2021. Disponible en línea: 17 Noviembre 2021
Editor: P. Beldomenico

RESUMEN. La leptospirosis continúa siendo hoy en día un problema para la salud pública, principalmente en poblaciones de bajos recursos socioeconómicos. En este trabajo se presenta la detección de leptospirosis patógenas en muestras ambientales (aguas y barro) provenientes de regiones del norte argentino (provincias de Formosa, Salta, Santiago del Estero, Misiones y Chaco) con variadas características climatológicas habitadas por poblaciones vulnerables. De las 89 muestras analizadas, en el 24,7% fue posible detectar molecularmente la presencia de leptospirosis patógenas. La prevalencia por tipo de muestra fue de 27,8% para las aguas y 11,8% para los barro. Todas las localidades muestreadas presentaron al menos una muestra positiva a alguna de las pruebas realizadas, por lo que el presente trabajo refleja la necesidad de profundizar los estudios de la leptospirosis en distintas regiones de la Argentina.

SUMMARY. *Leptospira* spp. (Spirochaetales: Leptospiraceae) detection in environmental samples from geographical regions inhabited by vulnerable communities in northern Argentina. Leptospirosis remains as a major public health problem nowadays, mainly affecting vulnerable communities with low socioeconomic resources. In this study, the molecular detection of pathogenic leptospires from environmental samples (water and mud) from northern Argentina (Formosa, Salta, Santiago del Estero, Misiones and Chaco provinces) is described. Samples were obtained from regions with varied climatological features, all inhabited by vulnerable communities. From the 89 samples that were analyzed, 24.7% showed molecular evidence of the presence of pathogenic leptospires. Prevalence by sample type was: 27.8% in water samples and 11.8% in mud samples. All the sampled regions showed at least one positive sample. This result highlights the need of further research regarding leptospirosis in different regions of Argentina.

Palabras clave: Leptospirosis, leptospirosis patógenas, poblaciones vulnerables, muestras ambientales

Keywords: Leptospirosis, pathogenic leptospires, vulnerable communities, environmental samples

Introducción

La leptospirosis es considerada una zoonosis mayor, tanto por su amplia distribución geográfica como por su frecuencia. Se estima que anualmente más de 1 millón de personas adquieren la enfermedad, de las cuales hasta 60 mil pueden llegar a tener un desenlace fatal (Costa et al., 2015). En Argentina, durante el 2019 se notificaron 2976 casos en total (Ministerio de Salud de la Nación, 2019). Actualmente es considerada una de las zoonosis reemergentes más relevantes por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Karpagam, 2020), lo cual pone en evidencia la gran importancia

que representa principalmente para las poblaciones vulnerables del mundo.

La enfermedad es causada por bacterias del género *Leptospira* spp. que abarca tanto especies capaces de infectar animales (domésticos y silvestres) como especies propias del medioambiente (Faine, 1982). Este género bacteriano, en permanente crecimiento, actualmente comprende 42 especies clasificadas en 4 subgrupos: P1 (antes conocidas como patógenas), P2 (antes consideradas intermedias), S1 y S2 (antes consideradas saprófitas) (Guglielmini et al., 2019). Los primeros dos subgrupos son capaces de infectar a los

animales y a los humanos, mientras que las últimas solo han sido aisladas de muestras ambientales y no existen evidencias hasta el momento de su capacidad de establecer una infección. La transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo con la orina de los animales infectados o de manera indirecta a través de la exposición a fuentes ambientales contaminadas con esta orina (ej. cursos de agua, barro). La leptospirosis puede variar en severidad desde un cuadro febril inespecífico y de curso benigno hasta severos cuadros de falla renal o multiorgánica o de hemorragia pulmonar que llevan a la muerte. La intensidad de la enfermedad depende de diversos factores, tanto del agente como del hospedador (Adler, 2015).

La incidencia de la leptospirosis es mayor en regiones tropicales y subtropicales con abundantes precipitaciones debido a que el ciclo epidemiológico de la enfermedad suele requerir de cursos de agua dulce (Goarant, 2019). Sin embargo, existen escasos estudios sobre esta enfermedad en regiones con climas más áridos. Por ejemplo, en Argentina solamente existen estudios sobre leptospirosis en muestras ambientales (aguas) en Santa Fe (Francois, 2013) y Buenos Aires (Gatti, 2004; Scialfa, 2018). A su vez, es sabido que las zoonosis emergentes y reemergentes como la leptospirosis afectan principalmente a las poblaciones de bajos recursos económicos, debido a que las precarias condiciones de infraestructura habitacional predisponen a una mayor exposición a los reservorios y las fuentes de infección (roedores, fuentes de agua dulce como ser charcos o zonas de inundación por ejemplo) (Adler, 2015). Así, la ausencia de información sobre esta enfermedad en las poblaciones vulnerables del norte argentino abre el interrogante del riesgo epidemiológico al cual están expuestas estos grupos poblacionales.

En el presente trabajo, se tomaron muestras ambientales (distintos cursos de agua dulce y barro) de diversas regiones geográficas de las provincias del norte argentino, habitadas por poblaciones de bajos recursos socioeconómicos, con el objetivo de determinar la presencia de leptospirosis en las mismas.

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de agua dulce (ej. agua de aljibe, de pozo, de represa, entre otros) y barro de distintos puntos geográficos en las provincias de Misiones, Formosa, Chaco, Salta y Santiago del Estero (Figura 1), durante los meses de agosto a diciembre de 2018. Estas localidades fueron seleccionadas por la facilidad de poder realizar el trabajo en terreno con personal local de la Fundación Mundo Sano. Los puntos de muestreo fueron seleccionados a conveniencia teniendo en cuenta las características previamente asociadas a la presencia de la bacteria (i.e. basurales, presencia de animales domésticos o de granja, lugares inundables, etc.).

Al momento del muestreo se anotó para cada muestra los siguientes datos según observación del personal de muestreo: tipo de muestra (agua o barro), tipo de cuerpo de muestreo (pozo, aljibe, río, represa, arroyo, zona inundada, otros), grado de urbanización (zona urbanizada o no urbanizada), presencia de animales (sí, no), presencia de caninos en la zona (sí, no), presencia de basurales a menos de 100 m del sitio de muestreo (sí, no). Estos datos fueron colectados para explorar alguna asociación entre éstas variables y el hallazgo de leptospirosis.

Las muestras de agua y barro fueron tomadas en tubos tipo Falcon de 50 mL hasta su capacidad máxima y remitidas refrigeradas al Laboratorio de Leptospirosis (Centro de Referencia de la OIE), Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar, en Buenos Aires, para su procesamiento.

Una vez recibidas en el laboratorio, las mismas se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento. Del total de muestras, se seleccionaron 74 aguas y 15 barros para su estudio bacteriológico y molecular (Tabla 1). El presente trabajo es un estudio preliminar, por lo que las muestras fueron seleccionadas en base a los datos recolectados para maximizar las probabilidades de detección bacteriana (ej. presencia de animales, basurales, etc). Las aguas y los barros fueron procesados de distinta forma, según los siguientes protocolos:

1. Muestras de agua: las mismas fueron sometidas a diagnóstico bacteriológico y molecular directo.
 - a. Se descongeló el agua a temperatura ambiente.
 - b. Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (rotor n° 5, centrífuga modelo RC5C, Sorvall Instruments).
 - c. Se sembraron 5 gotas del sobrenadante en 10 mL de medio de cultivo semisólido Fletcher (Difco) suplementado con neomicina (10 mg/L) y 5-fluorouracilo (100 mg/L), por triplicado.
 - d. Luego de descartar el 50 % del volumen de agua restante, se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (rotor n° 5, centrífuga modelo RC5C, Sorvall Instruments).
 - e. Se descartó el sobrenadante y se aspiraron 30 µL del pellet formado para extracción de ADN con resina Chelex-100 (BioRad) según protocolo establecido (Grune, 2014).
 - f. El ADN extraído fue sometido a una PCR dúplex a punto final diseñada *in house* para detectar y diferenciar *Leptospira* spp. de los subgrupos P1 y P2 en un mismo paso (ver más adelante).
2. Muestras de barro: fueron sometidas a diagnóstico bacteriológico.
 - a. Se descongeló el barro a temperatura ambiente y se alicuotaron 5 g en otro tubo tipo Falcon de 50 mL.
 - b. Se agregaron 30 mL de PBS estéril (pH 8), se agitó vigorosamente para homogeneizar la muestra y

se dejó decantar durante 2 horas a temperatura ambiente.

- c. Se sembraron 5 gotas del sobrenadante en mL de medio de cultivo semisólido Fletcher (Difco) suplementado con neomicina (10 mg/L) y 5-fluorouracilo (100 mg/L), por triplicado.

Los cultivos se incubaron a 30 °C en aerobiosis y se controlaron con microscopía de campo oscuro cada 15 días en busca de crecimiento de bacterias compatibles por morfología y motilidad con *Leptospira* spp.

A todos aquellos cultivos que presentaron desarrollo de bacterias sospechosas de *Leptospira* spp. (aguas y barros) se les extrajo ADN mediante el uso de la resina Chelex-100 y se sometió el templado a una PCR dúplex para detectar la presencia de leptospiras de los subgrupos P1 y P2. Los controles positivos utilizados fueron *Leptospira interrogans* serovar Pomona cepa Pomona para el clado P1 y *L. fainei* serovar Hurstbridge cepa BUT6 para el clado P2. Todas las reacciones se llevaron a cabo con agua libre de nucleasas como control negativo.

Descripción de la PCR dúplex:

La misma fue diseñada de manera tal de detectar diferencialmente la presencia de material genético de leptospiras de los subgrupos P1 y P2. Para la detección del grupo P1, se amplificó el gen *secY* mediante el set de cebadores G1/G2 (Gravekamp et al., 1993). En el caso del grupo P2 se amplificó el gen *rrs* mediante el uso del set de cebadores 16SFw/16SRv, los cuales fueron diseñados *de novo* utilizando las secuencias disponibles en GenBank (Tabla 2).

La reacción se realizó a un volumen final de 50 µL por muestra con la mezcla de reactivos según la Tabla 3.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador MyCycler (BioRad) de la siguiente manera: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, luego 35 ciclos de 1,5 minutos a 94 °C, 1 minuto a 57 °C y 2 minutos a 72 °C, y un ciclo final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR (15 µL) se revelaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio a 100 V durante 60 minutos (PowerPac Basic, BioRad). Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron mediante exposición a luz UV (transiluminador UVI Tec BTS-20.M). Los tamaños de los amplicones se estimaron usando CienMarker (PB-L).

Figura 1. Mapas de los sitios de muestreo. A-Clorinda, Formosa. B-Tartagal, Salta. C-Puerto Iguazú, Misiones. D-Añatuya, Santiago del Estero. E-Pampa del Indio, Chaco.

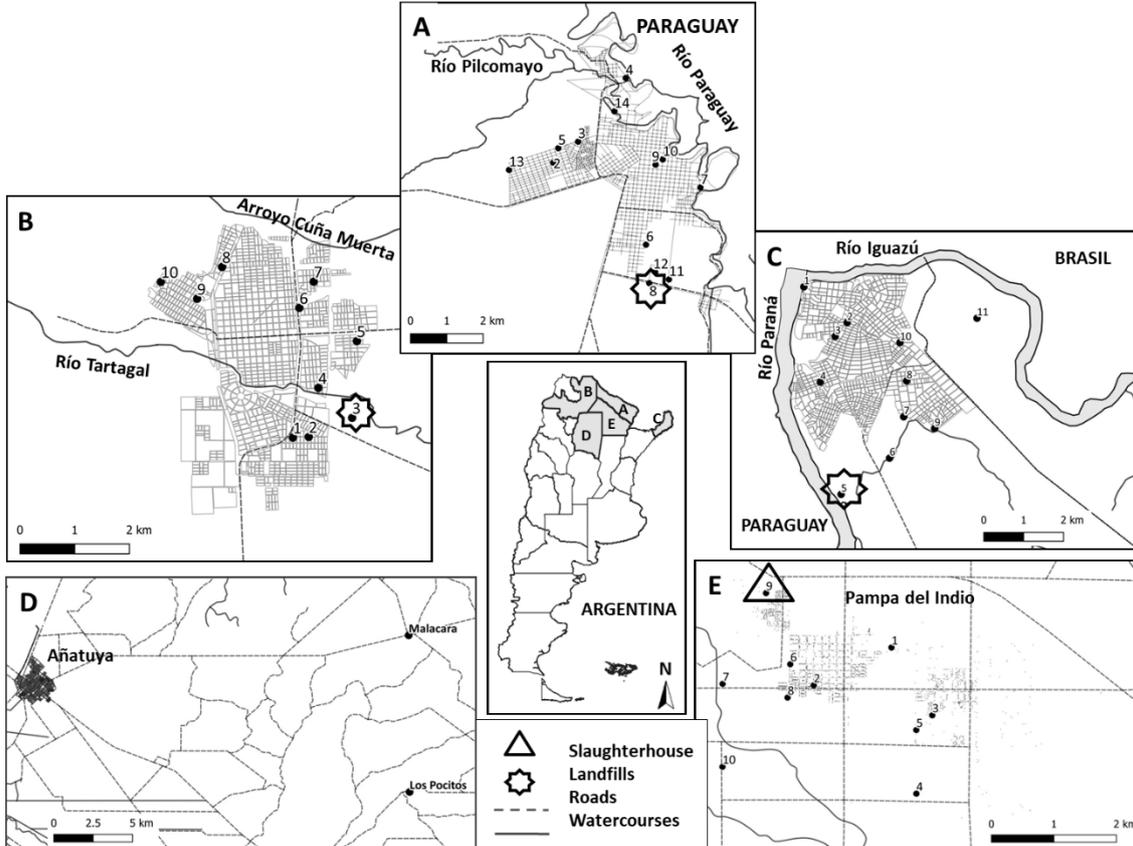


Tabla 1. Muestras analizadas según tipo de muestra y lugar de muestreo

Provincia	Localidad	Número de muestras	
		Agua	Barro
Formosa	Clorinda	4	1
Salta	Tartagal	22	1
Santiago del Estero	Añatuya	31	10
Santiago del Estero	El Malacara	2	1
Misiones	Puerto Iguazú	12	1
Chaco	Pampa del Indio	3	1
Número total de muestras		74	15

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección del material genético de leptospiras de los subgrupos P1 y P2

Gen diana	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto	Especies detectadas	Fuente
secY	G1	CTGAATCGCT GTATAAAAGT	285 bp	<i>L. interrogans</i> <i>L. borgpetersenii</i> <i>L. weilii</i> <i>L. noguchii</i> <i>L. santarosai</i> <i>L. meyeri</i>	Gravekam p et al., 1993
	G2	GGAAAACAAA TGGTCGGAAG			
rrs	16S Fw	TAAAGCACCG GCTAACTACG	640 bp	Leptospiras intermedias	Dise- ñado <i>in</i> <i>house</i>
	16S Rv	ACTNAATGGT AGCAACATAC GATAG			

Tabla 3. Reactivos utilizados para la amplificación de una muestra mediante la PCR dúplex

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x	5
MgCl ₂	3
dNTPs	0,5
Agua libre de nucleasas	37,25
Cebador G1 (50 mMol)	0,5
Cebador G2 (50 mMol)	0,5
Cebador 16SFw (50 mMol)	0,5
Cebador 16SRv (50 mMol)	0,5
Taq polimerasa	0,25
Templado	2
Total	50

Resultados

De las 89 muestras analizadas, 22 (24,7%) resultaron positivas a alguna de las pruebas diagnósticas empleadas para la detección de leptospiras. La prevalencia por tipo de muestra fue de 27,8% para las aguas y 11,8% para los barros. Todos los amplicones obtenidos en la PCR presentaron el mismo tamaño que el control positivo del clado de las leptospiras patógenas (P1). No se obtuvieron muestras positivas compatibles con especies del grupo P2.

Los resultados positivos obtenidos se resumen en las Tablas 4 y 5. Las muestras que resultaron positivas en El Malacara, Pampa del indio, Puerto Iguazú, Clorinda y Tartagal, son muestras colectadas en basurales o cerca de basurales (<100 metros de distancia), con el consiguiente riesgo de presencia de roedores y caninos. En cambio, las muestras de Añatuya, fueron colectadas de diferentes fuentes de agua para consumo (ya sea humano o animal), incluyendo pozos comunitarios o individuales, agua de lluvia almacenada o represas presentes en las viviendas de los habitantes de la región. Según los datos colectados en terreno, en ambos lotes rurales incluidos en el muestreo, El Malacara y Los Pocitos-Tacañita, se observó presencia de diferentes animales (cabras, gallinas, cerdos, caballos). A su vez, todas las viviendas muestreadas poseían perros (en general, más de uno).

Discusión

Todas las localidades muestreadas presentaron al menos una muestra positiva a alguna de las pruebas realizadas. Este es el primer trabajo en el país en analizar muestras ambientales de dichas localidades. Este hecho, sumado a que en este trabajo se hallaron muestras positivas en regiones que, por su clima más bien árido, no se consideran de riesgo epidemiológico para la leptospirosis (Salta, Santiago del Estero, Chaco, Formosa), pone de manifiesto la necesidad de profundizar el estudio de la leptospirosis en el territorio argentino, incluyendo aquellas regiones geográficas hasta ahora no tenidas en cuenta para la enfermedad. A pesar de que existen antecedentes en alguna de ellas, como el aislamiento de una cepa de un aborto en caprinos en Salta (Micheloud et al., 2015) y notificación de datos en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina (SIVILA) (Tabla 6), la información disponible es aún escasa, dado que no existen estudios previos de detección de estos patógenos en el ambiente en estas regiones. La mayor disponibilidad de información permitirá profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, lo cual facilitará la toma de decisiones para la prevención de la enfermedad en humanos.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección del material genético de leptospiras de los subgrupos

Muestra	Tipo de muestra	Provincia	Localidad	PCR a partir del pellet	PCR a partir de cultivo
1	Barr o	Chaco	Pampa del Indio	No realizado	Patógenas
2	Agua	Formosa	Clorinda	Patógenas	No realizado
3	Agua	Misiones	Pto. Iguazú	Patógenas	No realizado
4	Agua	Misiones	Pto. Iguazú	Patógenas	No realizado
5	Agua	Salta	Tartagal	Negativo	Patógenas
6	Agua	Salta	Tartagal	Negativo	Patógenas
7	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	Negativo
8	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
9	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
10	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
11	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
12	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	Negativo
13	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
14	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
15	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
16	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
17	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
18	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
19	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
20	Agua	Sgo. del Estero	Añatuya	Patógenas	No realizado
21	Barr o	Sgo. del Estero	Añatuya	No realizado	Patógenas
22	Agua	Sgo. del Estero	El Malacara	Negativo	Patógenas

La leptospirosis, como la mayoría de las enfermedades zoonóticas, representa un gran riesgo principalmente para aquellas personas de bajos recursos socio-económicos que viven en condiciones de precariedad. La urbanización no planificada junto con la estrecha convivencia con una gran densidad de animales de compañía, domésticos y sinantrópicos genera un nicho

ecológico-epidemiológico ideal para el desarrollo de enfermedades zoonóticas y vectoriales en estas poblaciones (Adler, 2015).

Tabla 5. Muestras positivas según localidad de muestreo.

	Analizado	Positivo	Porcentaje positividad
Añatuya	41	15	36,58
Clorinda	5	1	20,00
El Malacara	3	1	33,33
Pampa del Indio	4	1	25,00
Puerto Iguazú	13	2	15,38
Tartagal	23	2	8,69
Total	89	22	24,71

Tabla 6. casos acumulados de leptospirosis hasta la semana epidemiológica n° 49 del año 2019 (desde el 1/1/2019 al 9/12/2019), según el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud – SNVS-C2/SIVILA para las regiones estudiadas en el presente trabajo (Ministerio de Salud de la Nación, 2019).

Provincia	Casos notificados	Casos confirmados
Salta	67	1
Chaco	214	5
Formosa	5	0
Misiones	114	5
Santiago del Estero	13	0

El presente trabajo preliminar demuestra la necesidad de realizar estudios posteriores respecto a la presencia de este tipo de patógenos en distintas muestras ambientales colectadas en regiones habitadas por poblaciones vulnerables en todo el territorio nacional.

La detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira* spp. en muestras ambientales en las inmediaciones de las viviendas de estas poblaciones debería alertar a los sistemas de salud humana para tener en consideración a la leptospirosis como una posible enfermedad frente a la aparición de casos con sintomatología compatible. Por otro lado, el presente trabajo abre las puertas para la realización de este tipo de estudios en nuevas zonas geográficas no consideradas anteriormente para esta enfermedad.

Agradecimientos

La presente investigación ha sido financiada por la Fundación Mundo Sano y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) a través del PICT 2016-1314. Agradecemos a Manuel Espinosa de Mundo Sano por la elaboración de los mapas. Los autores declaran que no tienen intereses financieros competitivos conocidos o relaciones personales que puedan haber influido en el trabajo reportado en este documento.

Referencias

Adler B. (eds). 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg. 387 pp.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLOS Neglected Tropical Diseases 9: 9. doi:10.1371/journal.pntd.0003898.

Faine S & World Health Organization. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/37219>.

Francois BS, Brihuega FB, Grune LS, Gattarello MV, Correa PD, Petrakovsky MJ, Gualtieri SC, Arestegui LM. 2013. Isolation of *Leptospira borgpetersenii* in water sources in Argentina. Revista Cubana de Medicina Tropical 65(2):177-184.

Gatti M, Arias D, Rosetti C, Selva S, Copes J, Laplace R, Martino P, Pellicer K, Stanchi N. 2004. Investigación de leptospiras en aguas de lagos del zoológico de La Plata, Argentina. Analecta Veterinaria 24: 18-20.

Goarant C, Trueba G, Bierque E, Thibeaux R, Davis B and De la Peña Moctezuma. 2019. *Leptospira* and Leptospirosis. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org> (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria). Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.26>

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone G, Van Eys G, Everard C, Hartskeerl R, Terpstra W. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. Microbiology 139:1691-1700.

Grune S. 2014. Aislamiento y caracterización genotípica de leptospiras provenientes de animales silvestres en tres ecoregiones argentinas mediante la técnica del Múltiple-Locus Variable-number tandem repeat Análisis (MLVA): Coincidencia con genotipos provenientes de animales de producción. [PhD Thesis]. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias; Buenos Aires, Argentina. 135 pp.

Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. 2019. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. PLoS Negl. Trop. Dis. 13: e0007374.

Karpagam KB, Ganesh B. 2020. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. Europ. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 39: 835-846.

Micheloud JF, Martínez M, Zurita SG, Grune S, Romero G, Brihuega B. 2015. Aborto por leptospira en una yegua en Salta, Argentina. FAVE Sección Ciencias Veterinarias 14: 37-40.

Ministerio de Salud de la Nación. 2019. Boletín integrado de Vigilancia N° 478, SE 51, p.70.

Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P, Rivero M. 2018. Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 50: 323-326.
