

## Presencia de *Leptospiras* en ecosistemas acuáticos de la región noreste de la provincia de La Pampa.

Tortone, C.A.<sup>1</sup>; Portu, A.I.<sup>1</sup>; Schenheiter, A.B.<sup>1</sup>; Lucero Arteaga, F.<sup>1</sup>; Giménez, M.E.<sup>1</sup>; Solano, A.<sup>1</sup>; Sánchez, C.<sup>1</sup>; Marengo, M.L.<sup>1</sup>; Fernández, L.<sup>1</sup>; Martín, P.L.<sup>1</sup> y Oriani D.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

<sup>2</sup>Actividad privada.

ctortone@vet.unlpam.edu.ar

### RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis reemergente causada por bacterias del género *Leptospira*. El cambio climático, la urbanización y el saneamiento inadecuado han llevado a convertirse en un problema latente para cualquier población. En nuestro país es frecuente la ocurrencia de brotes estacionales después de inundaciones, las cuales llevan al contacto con agua y suelos contaminados con orina de animales domésticos y silvestres. El género *Leptospira* se ha dividido en tres grupos filogenéticos: patógenas, intermedias y no patógenas. Se encuentra en estudio el rol que juegan las especies de patogenicidad intermedia. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de leptospiras en aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa mediante el cultivo y posterior identificación de leptospiras con el uso de técnicas de PCR y qPCR. Hasta el momento se procesaron 71 muestras de agua (41 de canales pluviales y 30 de humedales), desde septiembre de 2021 a febrero de 2024, registrándose meses con muy pocas precipitaciones, incluyendo valores de lluvias acumuladas por debajo de los mínimos notificados en los últimos años. Las muestras de agua procesadas se sembraron en Fletcher con 5-fluorouracilo (200 µg/ml) y Neomicina (10 µL/mL), se incubaron 180 días a 28-30°C y se observaron mediante microscopía de campo oscuro. Se recuperaron espiroquetas en el 12,7% (n=9) de las muestras. A partir de los cultivos positivos, se realizó la extracción de ADN utilizando un kit comercial. Para la detección de leptospiras patógenas se realizó una qPCR que detecta la presencia del gen *lipL32*, utilizando los oligonucleótidos LipL32F y LipL32R. Luego se llevó a cabo una PCR convencional específica de género para *Leptospira* spp. a través de la amplificación de un fragmento del gen 16S rARN (*rrs*) y la utilización de los oligonucleótidos LeptoA y LeptoB. Los productos de PCR amplificados se purificaron y se acondicionaron de acuerdo a los requerimientos solicitados por el laboratorio de secuenciación (Macrogen, Seoul, South Korea). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las incluidas en la base de datos BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ninguna de las espiroquetas recuperadas fue detectada como leptospiras del grupo patógenas. Se pudo confirmar que todas pertenecen al género *Leptospira*, identificándose como: *Leptospira*



*ellinghausenii/Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri* (95-100% identidad) (n=5), *Leptospira idonii* (93-97%) (n=2), *Leptospira vanthielii* (100%) (n=1) dentro del grupo saprófitas, y *Leptospira fainei* (95%) (n=1), dentro del grupo intermedia. La temperatura de las muestras positivas osciló entre 14,5 y 30°C y el pH entre 6 y 8. Son escasos los reportes de aislamientos de leptospirosas intermedias en nuestro país y aún no se han detectado en poblaciones animales. En otros países se ha aislado *L. fainei* en pacientes humanos enfermos con síntomas asociables con leptospirosis y se ha demostrado que puede localizarse en los testículos y epidídimos de ejemplares de jabalí y en cerdos domésticos, pudiendo intervenir en el éxito reproductivo. El estudio de las leptospirosas intermedias podría explicar los casos subclínicos, y en aquellos que no llegan a un diagnóstico de confirmación deberían implementarse herramientas adecuadas para su detección.

Palabras clave: Leptospirosas, clima templado, intermedias, agua.

## Presence of *Leptospira* in aquatic ecosystems of the northeastern region of La Pampa province

### ABSTRACT

Leptospirosis is a reemerging zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Climate change, urbanization, and inadequate sanitation have led it to become a latent problem for any population. In our country, the occurrence of seasonal outbreaks after floods is common, leading to contact with water and soils contaminated with the urine of domestic and wild animals. The genus *Leptospira* has been divided into three phylogenetic groups: pathogenic, intermediate, and non-pathogenic. The role played by species of intermediate pathogenicity is under study. The objective of this work is to determine the presence of leptospires in environmental waters of the northeastern region of the province of La Pampa by culturing and subsequent identification of leptospires using PCR and qPCR techniques. So far, 71 water samples have been processed (41 from stormwater channels and 30 from wetlands), from September 2021 to February 2024, with months recording very little precipitation, including accumulated rainfall values below the minimums reported in recent years. The processed water samples were inoculated in Fletcher with 5-fluorouracil (200 µg/ml) and Neomycin (10 µL/mL), incubated for 180 days at 28-30°C, and observed using dark field microscopy. Spirochetes were recovered in 12.7% (n=9) of the samples. From the positive cultures, DNA extraction was performed using a commercial kit. For the detection of pathogenic leptospires, a qPCR was performed to detect the presence of the *lipL32* gene, using the oligonucleotides LipL32F and LipL32R. Then, a conventional gender-specific PCR for *Leptospira* spp. was carried out through the amplification of a fragment of the 16S rRNA gene (*rrs*) and the use of the oligonucleotides LeptoA and LeptoB. The amplified PCR products were purified and prepared according to the requirements requested by the sequencing laboratory (Macrogen, Seoul, South Korea). The obtained results were analyzed using the Clustalw program (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). The obtained sequences were compared with those included in the BLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



None of the recovered spirochetes were detected as leptospires from the pathogenic group. It was confirmed that all belong to the genus *Leptospira*, which were identified as: *Leptospira ellinghausenii/Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri* (95-100% identity)(n=5), *Leptospira idonii*(93-97%)(n=2), *Leptospira vanthielii*(100%)(n=1) within the saprophytic cluster, and *Leptospira fainei* (95%) (n=1), within the intermediate cluster. The temperature of the positive samples ranged between 14.5 and 30°C and the pH between 6 and 8. There are few reports of isolations of *Leptospira intermedia* in our country, and they have not yet been detected in animal populations. *L. fainei* has been isolated in human patients with symptoms associated with leptospirosis, and it has been shown to be found in the testicles and epididymis of wild boars and domestic pigs, potentially affecting reproductive success. The study of intermediate leptospires could explain subclinical cases, and those that do not reach a confirmation diagnosis, appropriate tools for their detection should be implemented.

Keywords: *Leptospira*, temperate climate, intermediate, water.

