

Primer aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de un feto de jabalí (*Sus scrofa*)

Brihuega, B.¹; Samartino, L.¹; Romero, G.¹; Auteri, C.¹; Martínez, M.¹; Grune Loffler, S.^{1,2}

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis mundial y es endémica en muchos países. Esta enfermedad se mantiene en la naturaleza por la infección renal crónica de los animales portadores; los roedores y otros mamíferos pequeños son los reservorios más importantes. Además, otras fuentes importantes de infección para el humano son los animales domésticos, como el ganado y los perros. El jabalí (*Sus scrofa*) es una especie introducida de Europa que está muy extendida en América y particularmente en el centro y sur de Argentina. Esta especie es muy valorada por los cazadores de la región y su carne se consume con mayor frecuencia. En muchos países del mundo (Europa, EE. UU. y Australia) se han realizado estudios sobre seroprevalencia, la seroreactividad no significa que el jabalí manifieste síntomas clínicos de leptospirosis o que los jabalíes sean reservorios de este patógeno bacteriano. Sin embargo, estos animales han estado en contacto con leptospirosis en su entorno en el pasado. Este estudio tiene el objetivo de tipificar molecularmente la cepa aislada obtenida a partir de 4 fetos de jabalíes (*Sus scrofa*) provenientes de la Patagonia argentina. Se realizaron necropsias de los 4 fetos y se cultivaron muestras de riñones, hígado, bazo y pulmón en medios Fletcher y EMJH. Además, las muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón de los fetos se procesaron y analizaron por inmunofluorescencia directa. Se utilizó el análisis de repeticiones en tándem de número variable de locus múltiple (MLVA) para caracterizar la cepa aislada. El perfil genético de la cepa de leptospira fue idéntica al perfil de *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3 perteneciente al serogrupo Ballum. Hasta donde sabemos, este es el primer aislamiento de *Leptospira* spp. de un feto de jabalí.

Palabras clave: *Leptospira* spp., jabalí, genotipo, MLVA, Patagonia, Argentina.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonose and is endemic in many countries. This disease is maintained in nature by chronic renal infection of carrier animals, being rodents and other small mammals the most important reservoirs. Also, significant sources of human infection are domestic animals, such as livestock and dogs. The wild boar (Sus scrofa) is an introduced species from Europe which is widespread in America and particularly in the Center and South of Argentina. This species is highly valued by hunters in the region and their meat is consumed more often. In many countries of the world (Europe, USA and Australia) studies of seroprevalence have been carried out, the seroreactivity does not mean that the wild boar has clinical symptoms of leptospirosis or that wild boars are maintenance host of this pathogen. However, these animals have been in contact to leptospirosis in their environment in the past. This study has the objective to molecularly genotype the pathogenic Leptospira sp. isolated strain obtained from fetuses of wild boars from Patagonia Argentina. Four fetuses were aborted from a wild boar (Sus scrofa) in Patagonia, the southern region of Argentina. Necropsy was performed of the 4 fetuses and samples of kidneys, liver, spleen and lung were

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Patobiología, Laboratorio de Leptospirosis, Centro de referencia de la OIE, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Hurlingham, Buenos Aires. Correo electrónico: brihuega.bibiana@inta.gob.ar

²CONICET, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: grune.sylvia@inta.gob.ar

cultivated in Fletcher and EMJH mediums. Also, samples of liver, spleen, lung and kidney of fetuses were processed and analyzed by direct immunofluorescence. Multiple Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA) was used to characterize the isolated strain. The genetic profile of the isolated pathogenic *Leptospira* sp. strain was identical to the profile of *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3, serogroup Ballum. To the best of our knowledge this is the first isolation of *Leptospira* spp. from a wild boar fetus.

Keywords: *Leptospira* spp., wild boar, genotype, MLVA, Patagonia, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica más extendida en el mundo. Es causada por una bacteria perteneciente al orden de las espiroquetas. Las cepas patógenas del género *Leptospira* spp. encuentran su nicho ideal para la transmisión en regiones subtropicales y tropicales. No hay datos disponibles sobre la incidencia de leptospirosis en varios países y, además, la enfermedad con frecuencia es subdiagnosticada y subnotificada, en consecuencia es considerada una enfermedad descuidada severamente (Hartskeerl *et al.*, 2011). Las cepas patógenas de leptospira infectan principalmente a los mamíferos, pero también se pueden encontrar en reptiles y anfibios (Levett, 2001, Adler y Peña, 2010). Esta zoonosis se mantiene en la naturaleza por la infección renal crónica de los animales portadores; los roedores y otros mamíferos pequeños son los reservorios más importantes. Además, fuentes importantes de infección humana son el ganado y los animales domésticos, como los perros. En Argentina, esta enfermedad es endémica y aún no se han implementado programas de control o prevención epidemiológica. Hasta la semana epidemiológica 51 del año 2019 se notificaron 2976 casos humanos al Ministerio de Salud Nacional en el país; la región del centro (Buenos Aires, CABA, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe) es la que cuenta con la mayor cantidad de casos notificados (2019) (Ministerio de Salud Nacional, 2019).

Por un lado, en Ellis *et al.* (1986) se establecieron cerdos domésticos como anfitriones de mantenimiento para el serogrupo Australis y en Jansen *et al.* (2007) para el serogrupo Pomona. Por otro lado, los jabalíes se clasifican como hospedadores accidentales para el serovar Grippothyphosa en Tremel *et al.* (2003) y en Jansen *et al.* (2007) para el serogrupo Pomona y Bratislava. Slavica *et al.* (2010) realizaron un estudio serológico en jabalíes en Croacia utilizando MAT, en este estudio los serovares más frecuentes fueron Australis (33,3%), Pomona (21,8%) y Tarassovi (14,3%) de un total de 351 muestras de suero, el título más alto obtenido fue 1/3200 para serovar Pomona. En un estudio serológico reciente de jabalíes (*Sus scrofa*) en Polonia (Zmudzki *et al.*, 2016) analizaron 3621 muestras de sangre de jabalíes en busca de *Leptospira* spp. serovares/serogroup: Icterohaemorrhagiae, Grippothyphosa, Sejore, Tarassovi, Pomona, Canicola, Bratislava, Autumnalis, Hardjo y Ballum. El serogrupo Ballum no dio títulos en las muestras de suero analizadas. Los serovares Pomona y Sejore se informan como los más comunes en cerdos domésticos en Polonia; sin embargo, (Zmudzki *et al.*, 2016) estos serovares fueron poco frecuentes. En el mismo estudio se menciona el aumento de la población de jabalíes de vida libre en Europa en las zonas urbanas y suburbanas, y la amenaza de una posible diseminación de cepas patógenas de leptospirosis es preocupante. La necesidad de controlar la población también constituye un

riesgo para los cazadores de infectarse con *Leptospira* spp. (Richard *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2007).

Además, la expansión geográfica de los humanos hacia áreas no urbanizadas está causando que los animales silvestres tengan que vivir en las cercanías de los habitantes de estos pueblos y ciudades. En el 2006, relacionaron un caso humano de leptospirosis en Berlín con la posible infección por agua dulce contaminada con orina de jabalí (Jansen *et al.*, 2006). En una revisión de los jabalíes como fuentes de infecciones en humanos y ganado (Meng *et al.*, 2009), solo se enumeran tres estudios de seroreactividad positiva: Alemania (Jansen *et al.*, 2007), California (EE. UU.) (Clark *et al.*, 1983) e Italia (Ebani *et al.*, 2003). En Jansen *et al.* (2007) las muestras de suero de jabalíes de las zonas urbanas de Berlín fueron analizadas por MAT, los serovares Pomona y Bratislava fueron los más frecuentes, estos resultados y la demostración de que se encontraron leptospirosis utilizando la tinción de plata en muestras de riñón de jabalíes indicaron que estos animales son animales de mantenimiento (reservorios) también en áreas urbanas. En Eslovenia (Vengust *et al.*, 2003) en un estudio de seroprevalencia de *Leptospira* spp. en 437 muestras de suero de jabalí se encontró que la prevalencia de anticuerpos de este estudio fue mayor (45,5%) que la prevalencia determinada en estudios previos: Italia (6%; Ebani *et al.*, 2003), República Checa (16,9%; Tremel *et al.*, 2003), Alemania (24%; Schönberg *et al.*, 1999), Polonia (25,2%; Krawczyk, 2000), Croacia (26%; Cvetnic *et al.*, 2003), Austria (30%; Deutz *et al.*, 2002) y Australia (20%; Mason *et al.*, 1998).

En Sudamérica no se han realizado muchos estudios de seroprevalencia en jabalí, sin embargo, en Brasil (2011) se realizó un estudio serológico con MAT en una población cautiva de jabalíes para consumo humano. En este estudio, 63 animales fueron positivos a *Leptospira* spp., los serovares mejor representados fueron: Hardjo, Copenhageni y Pomona (Fornazari *et al.*, 2011).

Hasta donde sabemos, este es el primer aislamiento de *L. borgpetersenii* de fetos de jabalíes (*Sus scrofa*). Existen muchos estudios sobre prevalencia en jabalíes a nivel mundial, sin embargo, aparentemente no existen estudios sobre aislamientos de cepas patógenas en este grupo animal. El objetivo de este trabajo fue aislar y genotipificar la cepa aislada a partir de los fetos recibidos en el laboratorio de Leptospirosis, Centro de referencia de la OIE, perteneciente al Instituto de Patobiología del CICVyA, INTA Castelar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Leptospira* spp.: se realizaron las necropsias de los 4 fetos, provenientes del parque nacional Nahuel Guapi (Patagonia), utilizando el protocolo descrito por Faine *et al.* (1999), y se cultivaron las muestras de riñones, hígado, bazo y pulmón en medios Fletcher y EMJH. Los cultivos se incubaron

a 28 °C hasta que se determinó el desarrollo, cada 15 días se observaron los cultivos bajo microscopía de campo oscuro.

Inmunofluorescencia: la tinción de inmunofluorescencia directa de las muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón se realizó con un conjugado multivalente FA, LEP-FAC (Seasinglab, Argentina) específico para *Leptospira* spp.

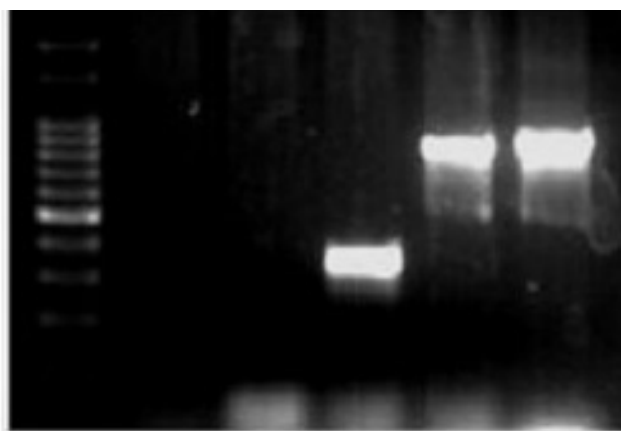
Caracterización molecular: las cepas de referencia y la cepa aislada se cultivaron en medios Fletcher (Laboratorios Difco) a 28 °C. Para las extracciones de ADN se usó el protocolo utilizado con la resina Chelex-100 (Bio Rad). Se usó el análisis de repeticiones en tándem de número variable de locus múltiples (MLVA) para caracterizar la cepa aislada con 1 conjunto de oligonucleótidos específicos para las cepas patógenas de *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii*, se usaron los siguientes loci: VNTRS: 4, 7, 10, Lb4 y Lb5 (Salaün *et al.*, 2006). El volumen final (50 µl) de cada mezcla de reacción contenía PCR Buffer (Tris-HCL 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM), desoxinucleósidos trifosfatos 200 µM, cada cebador correspondiente 2 µM, MgCl₂ 2 mM, ADN polimerasa Taq 1.25U (Invitrogen) y plantilla de ADN 5 µl. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Thermo Scientific PxE 0,2 de la siguiente manera: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 90 segundos, con un ciclo final a 72 °C durante 10min. Las muestras amplificadas (15 µl) se revelaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con 0,2 µg/ml de bromuro de etidio a 100 V durante 50 minutos. Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron tras la exposición a la luz UV (transiluminador Uvi Tec BTS-20.M). Los tamaños de amplicón se estimaron usando CienMarker (Biodynamics) y el programa GelAnalyzer 2010a. Para calcular el número de copias repetidas se utilizó la siguiente fórmula: Número de repeticiones (pb) = [Tamaño de fragmento (pb) - Regiones de flanqueo (pb)] / Tamaño de repetición (pb). Los números de copia repetidos se redondearon a los números enteros más cercanos. Si el número de copia era menor que uno, se redondeó a cero.

RESULTADOS

La inmunofluorescencia directa fue positiva en el hígado, el bazo y el riñón de los fetos. Se aisló una cepa de *Leptospira* spp. de riñones e hígado en medio Fletcher después de 47 días de incubación a 28 °C. El genotipo del aislamiento determinado por MLVA, coincide con el perfil genético de *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3 (-, -, 1,4,6) del serogrupo Ballum (figura 1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Hasta donde sabemos, esta es la primera cepa de *Leptospira borgpetersenii* aislada de jabalíes en América del Sur obtenida de fetos abortados (figuras 2 y 3). Este hallazgo sugiere que los jabalíes son susceptibles a *L. borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3 del serogrupo Ballum. Este genotipo se caracterizó previamente en poblaciones de ratones en Argentina (Grune *et al.*, 2013). La misma especie *L. borgpetersenii* se aisló en muestras de agua en un río urbano en Argentina (Francoise *et al.*, 2013) y se aisló en casos clínicos de animales domésticos (Grune *et al.*, 2016) y humanos (Goncalves *et al.*, 2010). Varios estudios sobre seroreactividad realizados en



| VNTR | 4 | 7 | 10 | Lb4 | Lb5 |
|--------|---|---|-----|-----|-----|
| bp | 0 | 0 | 377 | 751 | 808 |
| Copies | - | - | 1 | 4 | 6 |

Figura 1. Genotipificación MLVA.



Figura 2. Feto jabalí abortado.



Figura 3. Feto jabalí abortado.

poblaciones de jabalíes (Europa, EE. UU., y Australia) (Clark *et al.*, 1983; Deutz *et al.*, 2002; Ebani *et al.*, 2003; Fornazari *et al.*, 2011; Jansen *et al.*, 2007; Krawczyk *et al.*, 2000; Manson *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2009; Saliki *et al.*, 1998, Schönberg *et al.*, 1999; Slavica *et al.*, 2010; Tremi *et al.*, 2003; Vengust *et al.*, 2003; Zwdzki *et al.*, 2016) muestran la exposición en el medioambiente y nichos ecológicos donde viven las poblaciones de jabalíes a cepas leptospiras patógenas. En este estudio se logró aislar una cepa a partir de un feto abortado de *Sus scrofa*, genotificada molecularmente empleando MLVA, demostrando la importancia que presentan los animales silvestres en la diseminación de cepas patógenas al medioambiente. Este hallazgo también refleja la posibilidad de infección en jabalíes, ya que la cepa fue aislada en fetos, sin embargo, no se encontraron restos de la madre en el lugar. Es importante profundizar estudios epidemiológicos no solo en jabalíes, sino también en otros animales silvestres y en el medioambiente, para poder conocer la casuística actual presente en el país y así poder tomar medidas de prevención en las zonas de mayor riesgo de contagio.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Proyecto Nacional INTA, AESA 202821.

BIBLIOGRAFÍA

- ADLER, B.; PEÑA MOCTEZUMA, A. 2010. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 27,287-96.
- CLARK, R.; JESSUP, D.A.; HIRD, D.; RUPPANNER, R.; MEYER, M.E. 1983. Serologic survey of California wild hogs for antibodies against selected zoonotic disease agents. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:1248-1251.
- CVETNIC, Z.; MARGALETIC, J.; TONCIC, J.; TURK, N.; MILAS, Z.; SPICIC, S.; LOJKIC, M.; TERZIC, S.; JEMERSIC, L.; HUMSKI, A.; MITAK, M.; HABRUN, B.; KRT, B. 2003. A serological survey and isolation of leptospire from small rodents and wild boars in the Republic of Croatia. *Vet Med Czech* 11:321-329.
- DEUTZ, A.; FUCHS, K.; SCHULLER, W.; MÜLLER, M.; KERBL, U.; KLEMENT, C. 2002. Studies on the seroprevalence of antibodies against *Leptospira interrogans* in hunters and wild boar from south-eastern Austria. *Z Jagdwiss* 48:60-65.
- DIRECCIÓN NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN DE SALUD. 2019. Boletín Integrado de Vigilancia N.º 478 SE 51/2019. Ministerio de Salud de Argentina. 89 p.
- EBANI, V.V.; CERRI, D.; POLI, A.; ANDREANI, E. 2003. Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.* 39, 718-722.
- FAINE, S, ADLER B, BOLIN C, PEROLAT P. 1999. Leptospire and leptospirosis. MediSci; Melbourne, Australia. 272.
- FORNAZARI, F.; CAMOSSO, L.G.; SILVA, R.C.; GUAZZELLI, A.; RIBEIRO, M.G.; CHIACCHIO, S.B.; LANGONI, H. 2011. Leptospiral antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* vol. 17 n.º 1 Botucatu. 94-97.
- FRANÇOIS, S.; BRIHUEGA, B.; GRUNE, S.; GATTARELLO, V.; CORREA, D.; PETRAKOVSKY, J.; GUALTIERI, C.; ARESTEGUI, M. 2013. Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. N.º 2.
- GRUNE LOFFLER, S.; SAMARTINO, L.; BRIHUEGA, B. 2016. Insights into genetic distances of isolated strains of pathogenic *Leptospira* spp. from humans, animals and environment using Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) genotypes. IPJZDPH-16-1943. *Journal of Zoonotic Diseases and Public Health*. In press.
- GRUNE LOFFLER, S.; PAVAN, M.E.; VANASCO, B.; SAMARTINO, L.; SUAREZ, O.; AUTERI, C.; ROMERO, G.; BRIHUEGA, B. 2014. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp. isolated from rodents in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* 2014: 1-5.
- GONCALVES, A.; PAIVA, C.; MELO-MOTA, F.; VIEIRA, M.L.; CARREIRA, T.; NUNES, M.; MOTA-VIEIRA, L.; AHMED, A.; HARTSKEERL, R.; HYDE, K.; COLLARES-PEREIRA, M. 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, azores, Portugal. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(3):148-153.
- HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17, 494-501.
- JANSEN, A.; NÖCKLER, K.; SCHÖNBERG, A.; LUGE, E.; EHLERT, D.; SCHNEIDER, T. 2006. Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 25:544-6.
- JANSEN, A.; LUGE, E.; GUERRA, B.; WITTSCHEIN, P.; GRUBER, A.D.; LODDENKEMPER, C.; SCHNEIDER, T.; LIERZ, M.; EHLERT, D.; APPEL, B.; STARK, K.; NÖCKLER, K. 2007. Leptospirosis in Urban Wild Boars, Berlin, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 13(5): 739-742.
- JORGE, S.; HARTLEBEN, C.P.; SEIXAS, F.K.; COIMBRA, M.A.; STARK, C.B.; LARRONDO, A.G.; AMARAL, M.G.; ALBANO, A.P.; MINELLO, L.F.; DELLAGOSTIN, O.A.; BROD, C.S. 2012. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): first isolation in Brazil. *Acta Trop.* 124(2):147-51.
- KRAWCZYK, M. 2000. Serological studies on leptospirosis in wild boar. *Med Weter* 56:440-443.
- LEVETT, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14:296-326.
- MASON, R.J.; FLEMING, P.J.; SMYTHE, L.D.; DOHNT, M.F.; NORRIS, M.A.; SYMONDS, M.L. 1998. *Leptospira interrogans* antibodies in feral pigs from New South Wales. *J Wildlife Dis* 34:738-743.
- MENG, X.J.; LINDSAY, D.S.; SRIRANGANATHAN, N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 364:2697-2707. Doi: 10.1098/rstb.2009.0086
- RICHARD, S.; OPLIGER, A. 2015. Zoonotic occupational diseases in forestry workers—*Lyme borreliosis*, tularemia and leptospirosis in Europe. 2015. *Ann Agric Environ Med*. 22:43-50.
- ROSSETTI, C.; BRIHUEGA, B.; AUTERI, C.; 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):578-582.
- SALAÜN, L.; MÉRIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. 2006. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 44, 3954-3962.
- SALIKI, J.T.; RODGERS, S.J.; ESKEW, G. 1998. Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J Wildlife Dis* 34:834-838.
- SCHÖNBERG, A.; LUTZ, W.; KAMPE, U. 1999. Investigation of serum samples of wild boar (*Sus scrofa* L-1758) for Leptospirosis. 1999. *Z Jagdwiss* 45:262-265.
- SLAVICA, A.; CVTNIC, Z.; KONJEVIC, D.; JANICKI, Z.; SEVERIN, K.; DEZDEK, D.; STARESINA, V.; SINDICIC, M.; ANTIC, J. 2010. Detection of *Leptospira* spp. serovars in wild boars (*Sus scrofa*) from continental Croatia. *Veterinarski Archiv* 80 (2), 247-257.
- TREML, F.; PIKULA, J.; HOLESOVSKA, Z. 2003. Prevalence of antibodies against leptospire in the wild boar (*Sus scrofa* L., 1758). *Vet Med Czech* 48:66-70.
- VENGUST, G.; LINDTNER-KNIFIC, R.; ZELE, D.; BIDOVEC, A. 2008. *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research*. Volume 54, Issue 4, 749-752 pp.
29. ZMUDZKI, J.; JABLONSKI, A.; NOWAK, A.; ZEBEK, S.; ARENT, Z.; BOCIAN, L.; PEJSAK, Z. 2016. First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. *Acta Vet. Scand* 58:3. DOI: 10.1186/s13028-016-0186-7