



INFORME BREVE

Primer aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo Bovis a partir de un caso clínico en Argentina



Ariel Alejandro Koval^{a,*}, Bibiana Felicitas Brihuega^c, Sylvia Grune Loffler^{c,d}, S. López^a, Marcos Saint Martin^a, Gustavo Germán Lagioia^a y Juan Ramón Insaugarat^b

^a Biogénesis-Bagó, Garín (Bs. As.), Argentina

^b Med. Vet. actividad privada, Saladillo (Bs. As.), Argentina

^c Laboratorio de Referencia para Leptospirosis OIE, INTA Castelar, (Bs. As.), Argentina

^d Consejo Nacional en Investigaciones en Ciencia y Tecnología (CONICET), CABA, Argentina

Recibido el 21 de junio de 2019; aceptado el 10 de octubre de 2019

Disponible en Internet el 31 de enero de 2020

PALABRAS CLAVE

Leptospirosis;
Serovar Hardjo tipo
Hardjo Bovis;
Bovinos;
Argentina

KEYWORDS

Leptospirosis;
Serovar Hardjo type
Hardjo Bovis;
Cattle;
Argentina

Resumen Se describe el primer aislamiento y la tipificación molecular de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis en Argentina, obtenido a partir de orina de vacas abortadas de un rodeo de cría ubicado en Saladillo, provincia de Buenos Aires. Los abortos coincidieron con un período de importantes inundaciones, en el que varios animales presentaron títulos serológicos sospechosos y posterior seroconversión. El porcentaje de abortos alcanzó el 3,5% del total del rodeo, compuesto por 1700 vacas, y se aisló el microorganismo en 7 de 20 muestras de orina obtenidas.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

First isolation of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjo Bovis from a clinical case in cattle in Argentina

Abstract We here describe the first isolation and molecular typing of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis in Argentina, obtained from urine of aborted cows from a breeding herd located in Saladillo, Buenos Aires Province. The abortions occurred in coincidence

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ariel.koval@biogenesisbago.com (A.A. Koval).

with important floods with many cows presenting suspicious serological titers and subsequent seroconversion. The percentage of abortions was 3.5% of a herd of 1700 cows and the microorganism was isolated from 7 of the 20 urine samples obtained.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La leptospirosis bovina ha sido descrita en muchas regiones ganaderas del mundo. Provoca elevadas pérdidas económicas debido a abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y muerte de animales, constituyendo siempre un factor de riesgo para los humanos que trabajan en estrecho contacto con animales portadores¹⁴.

El avance de la biología molecular permitió poner de manifiesto una enorme diversidad genética en el género *Leptospira* y ha modificado radicalmente su taxonomía. La comparación de la cepa de referencia Hardjoprajitno con cepas aisladas de bovinos en Estados Unidos permitió establecer importantes diferencias a nivel genético, a pesar de que serológicamente eran indistinguibles⁸. Se comenzó a discriminar al serovar Hardjo en tipos o genotipos Hardjoprajitno y Hardjo Bovis.

En la actualidad, la clasificación genética refleja estas diferencias, ya que el genotipo Hardjoprajitno está incluido dentro de la genomoespecie *Leptospira interrogans* y el genotipo Hardjo Bovis dentro de la genomoespecie *Leptospira borgpetersenii*.

La importancia epidemiológica de esta diferenciación es que el hospedero de mantenimiento de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo Bovis es el bovino, especie animal a la cual está adaptado. Dicho serovar se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo².

En Argentina, existen numerosos reportes de aislamientos de leptospirosis de casos clínicos en bovinos, donde el serovar predominante ha sido Pomona, con algunos aislamientos esporádicos de Canicola^{1,4,7}.

Hasta la fecha no existen reportes de aislamiento de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis de casos clínicos de leptospirosis bovina. Sin embargo, dentro de la región, se han reportado aislamientos de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis en Chile¹³, Brasil³ y Uruguay¹⁴.

El objetivo de este trabajo es describir el primer aislamiento de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis a partir de un caso clínico de leptospirosis bovina en Argentina.

El brote se presentó en un establecimiento de cría próximo a la localidad de Saladillo (35° 38' 22.1''S 59° 46' 57.6''W), provincia de Buenos Aires, durante los meses de abril y mayo del 2017, en un período de elevadas precipitaciones e inundaciones, que afectaron a gran parte de la región pampeana. En el establecimiento se vacunó para la prevención de enfermedades reproductivas, entre ellas leptospirosis. La vacuna incluía únicamente al serovar Pomona. Se presentaron abortos en aproximadamente un 3,5% de un total de 1.700 vacas entre abril y mayo. El veterinario asesor remitió muestras pareadas de suero a un laboratorio privado para estudios serológicos. Se encontraron títulos positivos

(entre 1:800 a 1:1.600) por microaglutinación y seroconversión frente a los serovares Wolffi y Hardjo.

Para intentar el aislamiento de leptospirosis, se extrajo orina de animales abortados. Se aplicó furosemida (Salix, 10ml por animal, por vía intravenosa) (MSD, N.J. USA.) a 20 vacas. La orina (50 ml) se colectó en un frasco plástico estéril de boca ancha a partir del chorro medio.

De cada muestra de orina se sembraron 0,2 ml en un tubo que contenía 5 ml de medio EMJH semisólido con 5-fluorouracilo. La siembra se hizo *in situ*, pocos minutos después de obtenida la muestra, al abrigo de la llama de un mechero.

De cada tubo sembrado se efectuaron inmediatamente 2 diluciones seriadas (1:10 y 1:100) en el mismo medio de cultivo.

Los tubos sembrados se llevaron al laboratorio a temperatura ambiente y se incubaron a 28-30 °C. La presencia de leptospirosis se observó al microscopio de campo oscuro entre los 10 y 15 días de incubación. Las cepas aisladas se repicaron a medio EMJH líquido para poder efectuar una tipificación por microaglutinación hasta nivel de serogrupo. Las 7 cepas aisladas se identificaron como pertenecientes al serogrupo Sejroe utilizando sueros hiperinmunes de referencia (Royal Tropical Institute [KIT]). Los títulos aglutinantes fueron de 1:12.800 con suero anti-Hardjo.

Los aislamientos se trasladaron desde Biogénesis Bagó al Laboratorio de Leptospirosis de INTA Castelar para su tipificación molecular.

Para la extracción de ADN genómico se tomaron 20 µl del cultivo en medio EMJH semisólido utilizando una resina quelante Chelex-100 (BIO-RAD, CA, USA). Una vez obtenido el ADN purificado, se congeló a -20 °C⁵.

Se puso a punto una PCR en tiempo final para la detección específica del serovar Hardjo Bovis utilizando un par de *primers* que amplifican el gen IS1533, el cual corresponde a 85 copias del genoma de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis¹⁰. Los *primers* utilizados fueron los siguientes: P1805 5'-GCGGAAAGTGAACCGTATCGAG-3' y P1809 5'-CTGATATTCGCGGGTTGGAAGG-3'. Los amplicones tienen 630 pares de bases. El volumen final de reacción fue de 25 µl y cada reacción de PCR contenía buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 200 µM dNTPs, 2 µM de cada *primer*, 1 mM MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 5 µl de templado de ADN. El programa de ciclado fue 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1,5 min, 67 °C durante 2 min, 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los amplicones obtenidos (15 µl) se corrieron en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 2X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y teñido con bromuro de

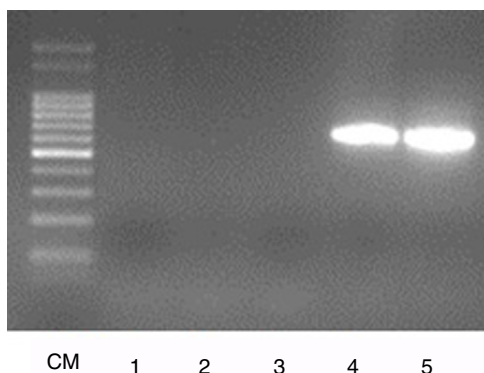


Figura 1 Amplificaciones obtenidas mediante PCR específica para el serovar Hardjo Bovis.

Los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa al 2%.

CM: CienMarker (marcador de PM); 1: serovar Pomona; 2: serovar Castellon; 3: serovar Canicola; 4: cepa aislada; 5: control+.

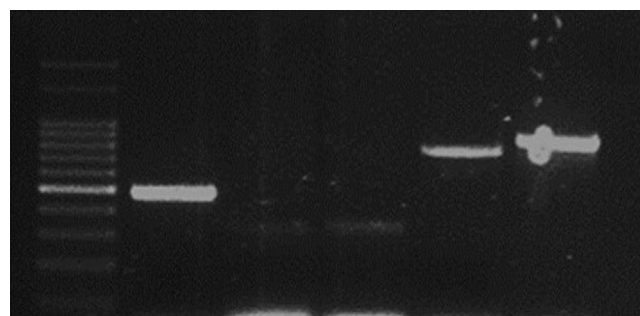
etidio 0,2 µg/ml durante 60 min a 100 V. El tamaño de los amplicones fue visualizado en un transiluminador de luz UV de cabina cubierta (Uvi Tec modelo BTS-20.M) (Uvi Tec, Cambridge, UK Embiotec, CABA, Argentina). Para ver el tamaño de las bandas obtenidas se corrió el gel con un marcador de 100 pb (Embiotec).

Se pueden observar, en la figura 1, los productos obtenidos con la PCR para el serovar Hardjo Bovis, lo cual confirma que las cepas aisladas pertenecen a este serovar.

Para la tipificación molecular de la cepa aislada se realizó MLVA, utilizando los primers propuestos por Salaün et al.¹⁰ para flanquear los loci: VNTR4 (4a.bis: 5'- AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA-3'; 4b.bis 5'- ATAAGGAAGCTCGGCGTTT), VNTR7 (7a.bis: 5'-GATGATCCCAGAGAGTACCG-3'; 7b: 5'-TCCCTCACAGGTTGTCTTG-3'), VNTR10 (10a.bis: 5'- GAGTTCAGAAGAGACAAAAGC-3'; 10b.bis 5'- ACGTATCTTCATATTCTTTGCG-3'), VNTRLb4 Lb4a: 5'-AAGAAGATGATGGTAGAGACG-3'; Lb4b: 5'- ATTGCGAAACCAGATTCCAC-3') y VNTRLb5 (Lb5a: AGCGAGTTCGCTACTTGC-3'; Lb5b: 5'-ATAAGACGATCAAGGAAACG-3'). El volumen final de reacción fue de 50 µl y cada reacción de PCR contenía buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 200 µM dNTPs, 2 µM de cada primer, 2 mM MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 5 µl de templado de ADN.

El programa de ciclado fue 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa, de acuerdo con lo descrito en el punto anterior. Se utilizó el programa GelAnalyzer 2010a (Gel Analyzer 19.1, Istvan Lazar Jr., PHD e Istvan Lazar Sr. PHD) (<http://www.gelanalyzer.com>), para determinar con exactitud los tamaños correspondientes a las bandas. A partir de esos datos se pudo calcular la cantidad de repeticiones o número de copias presentes (alelos), con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de repeticiones (pb)} = [\text{Tamaño de fragmento (pb)} - \text{Regiones de flanqueo (pb)}]$$



| CM | 4bis | 7bis | 10bis | Lb4 | Lb5 |
|-----|------|------|-------|-----|-----|
| Pb | 500 | 307 | 323 | 759 | 854 |
| Rep | 2 | 0 | 1 | 5 | 4 |

Figura 2 Amplificaciones obtenidas por MLVA de la cepa aislada.

Los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa al 2%.

CM: CienMarker (marcador de PM); VNTR amplificados: 4 bis; 7 bis; 10bis; Lb4 y Lb5; Pb: pares de bases; Rep: repeticiones.

Con el número de repeticiones o copias para cada VNTR flanqueado ya determinado, se obtiene un código numérico de la cepa tipificada. Este código representa el genotipo de la cepa y se compara con la tabla de repeticiones publicada en el trabajo de Salaün et al.¹⁰. De esta manera, se determinó que la cepa aislada presentaba un perfil genético idéntico a *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis cepa Sponselee (2, 0, 1, 5, 4) (fig. 2).

Una vez finalizada la tipificación en Argentina, se remitieron las cepas aisladas al KIT con sede en Holanda, para obtener la confirmación en un laboratorio de referencia a nivel mundial. La tipificación serológica confirmó que los aislamientos remitidos pertenecían al serogrupo Sejroe, serovar Hardjo. La identificación a nivel de serovar se realizó por microaglutinación con un panel de anticuerpos monoclonales, según Terpstra et al.¹².

Esta tipificación se complementó con PCR para discriminar entre *L. interrogans* serovar Hardjoprajitno y *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis, dado que no pueden ser diferenciadas serológicamente. El resultado confirmó que los aislamientos remitidos pertenecen a *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis.

En este trabajo se describe por primera vez la caracterización molecular de cepas aisladas de un caso clínico bovino como *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis en el país, confirmando su implicancia como agente causal de abortos en bovinos.

La presentación clínica difiere bastante respecto de los casos en los que está involucrado el serovar Pomona, considerando que en esas ocasiones los abortos suelen presentarse en forma de tormenta, en el último tercio de la gestación y en porcentajes muy elevados, que pueden alcanzar hasta el 50%. Los abortos, en el caso descrito en este trabajo, se produjeron en el tercio medio de la gestación y en un porcentaje de animales mucho más bajo (3,5% sobre un rodeo de 1.700 animales), en un período de aproximadamente 2 meses.

Estos últimos 2 factores dificultan la visualización del problema por parte del personal responsable de la hacienda: un porcentaje relativamente bajo de pérdidas y con abortos más tempranos y, por ende, de menor tamaño, que no se encuentran en el campo y no disparan una alerta para consultar al veterinario. El resultado final suele ser un porcentaje de vacas sin ternero al pie al final de la parición, cuando la confirmación del diagnóstico resulta muy dificultosa, si no imposible.

La identificación precoz de este rodeo en el momento en que se estaban produciendo los abortos, la toma de muestras, la siembra inmediata de la orina (en el campo) y la selección de los medios de cultivo resultaron claves para poder aislar este microorganismo en 7 de 20 animales muestreados.

Desde hace muchos años existe evidencia serológica que indica la presencia del serovar Hardjo en nuestro país, sumado a escasos aislamientos a partir de material obtenido en frigoríficos⁹.

Este primer aislamiento de un caso clínico constituye solamente un primer paso, considerando que se deben seguir obteniendo aislamientos y efectuar estudios que permitan caracterizar la enfermedad en nuestro entorno.

Se debe desarrollar conocimiento a fin de entender la epidemiología y la patogenia a nivel local y regional, así como reproducir experimentalmente la enfermedad en animales jóvenes, en hembras que van a recibir servicio y en hembras preñadas. Asimismo, es importante investigar su presencia en el aparato genital, donde también está descripta su localización.

Es necesario estudiar el papel de este serovar en explotaciones lecheras, donde en teoría debería estar mucho más difundido dado el estrecho contacto entre animales.

El papel potencial de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis como agente zoonótico no ha sido aún suficientemente investigado, dado que los casos reportados de leptospirosis rural en humanos son escasos, y cuando se han efectuado aislamientos o serología de los pacientes, el serovar involucrado fue Pomona^{6,11}.

La metodología utilizada para la toma de muestras con aplicación de diurético, siembra inmediata en el campo, medio de cultivo y diluciones permitió aislar *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Bovis en 7 de 20 animales muestreados (35%), un porcentaje de recuperación elevado considerando la dificultad intrínseca de aislar leptospirosis, y más aún, tratándose particularmente de este serovar.

La tipificación realizada en Argentina por microaglutinación hasta nivel de serogrupo, PCR y MLVA fue confirmada por los resultados efectuados en un centro de referencia mundial como el KIT. De este modo, se demostró la participación de este serovar como agente causal de abortos bovinos en Argentina.

Financiación

Laboratorio Biogénesis Bagó.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Dra. Julie Collins-Emerson, de Nueva Zelanda, por compartir desinteresadamente sus métodos para el aislamiento.

Bibliografía

- Bardón JC, Noceda RP, Martínez AH, Cordeviola JM, Combessies GM, Yurno OA. Leptospirosis bovina: aislamiento y tipificación de *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Resultados serológicos en 2 brotes del partido de Azul, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Med Vet (Buenos Aires). 1993;74:70-2.
- Bolin C, Thiermann A, Handsaker A, Foley J. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. Am J Vet Res. 1989;50:161-5.
- Chideroli R, Pereira U, Gonçalves D, Nakamura A, Alfieri AA, Alfieri AF, Freitas J. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. Genet Mol Res. 2016;15, gmr.15018873.
- Draghi MG, Brihuega B, Benítez D, Sala JM, Biotti G, Pereyre M, Homse A, Guariniello L. Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2011;43:42-4.
- Grune Löffler S, Rago V, Martínez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G, Brihuega B. Isolation of a seawater tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). Plos ONE. 2015;10:1-10.
- Koval A, López S, Saint Martin M, Lagioia G, Ferreyra A, Castillo C, Villa M. Brote de leptospirosis enterneros asociado al serogrupo canicola. Vet Arg. 2018;35:1-6.
- Koval A, López S, Lagioia G, Bertino R, Romera M, Scialfa E. Brote de leptospirosis en bovinos y humanos en un tambo de Lincoln, Provincia de Buenos Aires. Vet Arg. 2017;34:1-8.
- Lefebvre R, Thiermann A, Foley J. Genetic and antigenic differences of serologically indistinguishable leptospires of serovar Hardjo. J Clin Microbiol. 1987;25:2094-7.
- Myers D, Jelambi F. Isolation and identification of *Leptospira* Hardjo from cattle in Argentina. Trop Geog Med. 1975;27:63-70.
- Salaün L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J Clin Microbiol. 2006;44:3954-62.
- Scialfa E, Gallicchio O, Cerruti S, Zungri R. Brote de leptospirosis humana en trabajadores rurales de la localidad de Magdalena: posible asociación de los bovinos como fuente de infección. Rev Col Vet Pcia Bs As. 2004;8:53-4.
- Terpstra W, Korver H, van Leeuwen J, Klatser PR, Kolk AH. The classification of Sejroe Group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. A. 1985;259:498-506.
- Zamora BJ, Riedemann GS, Cabezas X. Primer aislamiento de *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo de útero bovino en Chile. Avances Cs Vet. 1992;7:10, 5354/0719-5273.2010.10431.
- Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry, et al. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12, e0006694.