

Leptospiras recuperadas de aguas superficiales del noreste de la provincia de La Pampa

Leptospire recovered from surface waters of the northeast of La Pampa province

Leptospiras recuperadas das águas superficiais do nordeste da província de La Pampa

Tortone CA¹, Schenheiter AB¹, Portu AI¹, Gimenez ME¹, Lucero Arteaga F¹, Marengo ML¹, Fernandez L¹, Martín PL², Oriani DS³.

Tortone, Claudia Andrea <https://orcid.org/0000-0002-0946-4771>, Schenheiter, Andrea Belen: <https://orcid.org/0009-0000-8611-8656>, Portu Ana Ines: <https://orcid.org/0000-0001-7596-6908>, Lucero Arteaga, Franco Exequiel: <https://orcid.org/0000-0002-8417-888X>, Gimenez Marisa Etel: <https://orcid.org/0000-0003-4022-3092>, Martín, Paula Lorena: <https://orcid.org/0000-0003-3584-0088>, Fernandez, Lorena: <https://orcid.org/0009-0005-1985-7535>, Marengo, Maria Lorena: <https://orcid.org/0009-0001-3737-7683>, Oriani, Delia Susana: <https://orcid.org/0000-0003-1218-1067>

⁽¹⁾ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Calle 5 esquina 116, General Pico (6360), La Pampa

⁽²⁾ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata Av. 60 y 118, B1900 La Plata, Buenos Aires

⁽³⁾ Investigador Independiente, General Pico, La Pampa, Argentina

Correo electrónico: ctortone@vet.unlpam.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.19137/cienvet.v28.9770>

Fecha de recibido: 23 de febrero de 2026 **Fecha de aceptado para su publicación:** 16 de marzo de 2026

Resumen

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial, producida por espiroquetas del género *Leptospira*. La incidencia de la enfermedad es mayor en climas cálidos y húmedos y los brotes estacionales son frecuentes después de inundaciones. Los animales domésticos y silvestres actúan como reservorios y eliminan leptospiras por la orina produciendo contaminación del medio ambiente. La asociación entre el contacto



con el agua ambiental y el riesgo de infección por *Leptospira* en climas templados no está totalmente claro. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de leptospiras patógenas y no patógenas en aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa mediante el aislamiento por cultivo y la posterior identificación de las genomoespecies mediante técnicas de biología molecular. El muestreo se efectuó después de los episodios de precipitación pluvial, en el período septiembre 2021–marzo 2025, registrándose meses con muy pocas precipitaciones. Se procesaron 86 muestras de agua de canales pluviales y humedales. Se recuperaron espiroquetas en el 10,5% (n=9) de las muestras. Ninguna de las cepas recuperadas presentó el gen *lipL32* característico de las especies patógenas. Mediante la secuenciación parcial del gen 16S rARN se determinaron las genomoespecies: *Leptospira ellinghausenii/Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri* (n=5), *Leptospira idonii* (n=2), *Leptospira vanthielii* (n=1), *Leptospira fainei* (n=1). Todas pertenecen al grupo saprófitas excepto *L.fainei*, incluida en el subclado P2 (grupo intermedias). Es necesario aplicar técnicas moleculares de última generación en conjunto con la determinación del serovar para poder identificar correctamente a las espiroquetas aisladas de aguas superficiales y así estimar su potencial riesgo para la salud humana y animal

Palabras clave: Leptospirosis, Aislamiento, Climas templados, PCR, Humedales

Abstract

Leptospirosis is zoonotic bacterial disease with worldwide distribution, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. The incidence of the disease is higher in warm, humid climates, and seasonal outbreaks are frequent after floods. Domestic and wild animals act as reservoirs and shed leptospire in their urine, contaminating the environment. The association between contact with ambient water and the risk of *Leptospira* infection in temperate climates remains is not fully understood. The aim of this study was to determine the presence of pathogenic and non-pathogenic leptospire in environmental water samples from the northeastern region of La Pampa province through isolation by culture followed by genomospecies identification using molecular biology techniques. Sampling was carried out after rainfall events, during the period September 2021–March 2025, during months with very low precipitation, 86 water samples from storm drains and wetlands were processed. Spirochetes were isolated from 10.5% (n=9) of the samples. None of the recovered strains carried the *lipL32* gene, a well-established marker of pathogenic species. Partial sequencing of the 16S rRNA gene determined the following genomospecies: *Leptospira ellinghausenii/Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri* (n=5), *Leptospira idonii* (n=2), *Leptospira vanthielii* (n=1), and *Leptospira fainei* (n=1). All isolates belonged to the saprophytic clade, except *L. fainei*, which is classified as belonging to the subclade P2 (intermediate group). The use of next-generation molecular approaches, together with serovar determination, is required for the accurate identification of spirochetes isolated from surface waters and for assessing their potential risk to human and animal health

Keywords: Leptospirosis, Isolation, Temperate climates, PCR, Wetlands

Resumo

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de distribuição mundial, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A incidência da doença é maior em climas quentes e úmidos, e surtos sazonais são frequentes após inundações. Animais domésticos e silvestres atuam como reservatórios e excretam leptospiros na urina, contaminando o ambiente. A associação entre o contato com água ambiental e o risco de infecção por *Leptospira* em climas temperados ainda não está totalmente esclarecida. O objetivo deste estudo foi determinar a presença de leptospiros patogênicos e não patogênicos em amostras de água ambiente da região nordeste da província de La Pampa, por meio de isolamento em cultura e posterior identificação das genomoespécies utilizando técnicas de biologia molecular. A amostragem foi realizada após os episódios de precipitação pluvial, no período de setembro de 2021 a março de 2025, sendo registrados meses com precipitações muito reduzidas, abaixo dos mínimos registrados nos últimos anos. Foram processadas 86 amostras de água provenientes de canais pluviais e áreas úmidas. Espiroquetas foram recuperadas em 10,5% (n=9) das amostras. Nenhuma das cepas recuperadas possuía o gene *lipL32*, característico de espécies patogênicas. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA determinou as seguintes genótipos: *Leptospira ellinghausenii*/*Leptospira yanagawae*/*Leptospira meyeri* (n=5), *Leptospira idonii* (n=2), *Leptospira vanthielii* (n=1) e *Leptospira fainei* (n=1). Todas pertencem ao grupo saprófita, exceto *L. fainei*, classificada no subclado P2 (grupo intermediário). A aplicação de técnicas moleculares de nova geração, em conjunto com a determinação do sorovar, é necessária para identificar com precisão as espiroquetas isoladas de águas superficiais e, assim, estimar seu risco potencial para a saúde humana e animal

Palavras-chave: Leptospirose. Isolamento, Climas temperados, PCR, Zonas úmidas

Introducción

La leptospirosis es causada por la espiroqueta *Leptospira*, una bacteria zoonótica que infecta a una amplia variedad de mamíferos y animales poiquilotermos en todo el mundo⁽¹⁾. Las leptospirosas patógenas pueden ser serotipificadas en más de 300 serovares diferentes sobre la base de los antígenos de su lipopolisacárido externo. Los serovares se organizan en serogrupos antigénicamente relacionados^(1, 2, 3). Sin embargo, la clasificación por serogrupos puede resultar confusa, ya que un mismo serovar puede encontrarse en distintas especies. Por esta razón, se ha impulsado la clasificación de las cepas de *Leptospira* basada en la composición de sus secuencias de ADN (Sequence Type, ST)⁽⁴⁾. De acuerdo con la información genómica disponible, las 68 especies actualmente reconocidas del género *Leptospira* se agrupan en dos subclados patógenos, P1

(patógenas) y P2 (patogenicidad intermedia), y dos subclados saprófitos, S1 y S2⁽³⁾. El subclado P1 se subdivide, a su vez, en especies patógenas de “alta virulencia” y de “baja virulencia”⁽⁵⁾.

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa zoonótica de importancia mundial asociada a niveles significativos de morbilidad y mortalidad. Sin embargo, suele ser subdiagnosticada y subestimada, lo que limita la adecuada determinación de su verdadera magnitud e impacto. En su carácter de enfermedad tropical desatendida, afecta a poblaciones en situación de vulnerabilidad socioeconómica, las cuales presentan un mayor riesgo de exposición a brotes de enfermedades zoonóticas⁽⁶⁾. La incidencia de la enfermedad es mayor en climas cálidos y húmedos y es frecuente la ocurrencia de brotes estacionales de leptospirosis después de inundaciones^(7, 8). La portación de leptospiras en animales domésticos y silvestres es el punto de partida y se diseminan a partir de la orina, donde se eliminan en forma discontinua y por periodos de tiempo variables, produciéndose contaminación de aguas, barro o bebederos. De esa manera el agua es el vehículo principal para infectar a otro individuo⁽⁶⁾. La asociación entre el contacto con el agua ambiental y el riesgo de infección por *Leptospira* en climas templados no está totalmente claro. En casos de leptospirosis humana en regiones templadas se ha descrito como fuentes de exposición ambiental implicadas el agua de grifo, pozos, aguas residuales y aguas recreativas⁽⁹⁾. En las poblaciones rurales en particular, la leptospirosis humana se ha atribuido al contacto directo con la orina del ganado infectado a través del cuidado de los animales⁽¹⁰⁾ y también a partir del agua ambiental⁽⁹⁾. En nuestro país existen varias referencias de brotes de leptospirosis en bovinos. Se han descrito en tambos, rodeos de cría y en establecimientos de engorde intensivo (feedlots), incluso alguno de dichos brotes ha implicado transmisión a humanos^(11, 12, 13, 14).

En Argentina, si bien las actividades vinculadas a ocupaciones rurales constituyen factores de riesgo significativos, el contacto prolongado con aguas de inundación ha sido identificado como el principal riesgo individual para la leptospirosis. En ámbitos urbanos, intervienen otros determinantes, tales como las condiciones de vida de la población, la urbanización no planificada, las viviendas precarias y la falta de saneamiento ambiental, factores que se ven agravados por los efectos del cambio climático, especialmente por el aumento de las precipitaciones e inundaciones⁽¹⁵⁾. La epidemiología de la leptospirosis es compleja y dinámica, ya que surgen nuevos grupos de riesgo a medida que se modifican el hábitat, las prácticas productivas y los reservorios animales, lo que requiere intervenciones integradas de Una Salud, que incluyan la vacunación dirigida, el control ambiental y la educación comunitaria^(16, 17). En este sentido, dos nuevas especies de roedores han sido incorporadas en los últimos años en nuestro país como hospedadores de leptospiras patógenas, no previamente descritas como reservorios⁽¹⁸⁾. Asimismo, se han detectado roedores positivos a *Leptospira* spp. tanto en sitios inundables como no inundables, lo que demuestra que las infecciones por este patógeno no se restringen exclusivamente a áreas anegadas⁽¹⁸⁾. Es importante señalar que nuestra región presenta un régimen climático propenso a inundaciones por precipitaciones abundantes. Si bien

existen algunos estudios sobre presencia de anticuerpos de leptospiras en animales reservorios de nuestra provincia^(19, 20), aún se desconoce la posible persistencia de esta espiroqueta en el ambiente y el riesgo potencial asociado.

Existe evidencia creciente de que *Leptospira* puede sobrevivir y mantenerse viable durante períodos prolongados en el ambiente, lo que incrementa la probabilidad de transmisión. La demostración de su capacidad para replicarse en suelos anegados resalta el papel central del agua en su ciclo fuera del hospedador. No obstante, debido a la escasez de investigaciones, aún no se han establecido con precisión las condiciones ambientales que favorecen la supervivencia de *Leptospira* en aguas superficiales⁽²¹⁾. Una de las principales limitaciones para la vigilancia ambiental de *Leptospira* radica en la complejidad del proceso de aislamiento bacteriano. Sin embargo, en los últimos años se han optimizado los métodos de detección a partir de muestras ambientales, reduciendo los tiempos de análisis en el laboratorio^(22, 23, 24). Entre estos métodos se destaca el cultivo de enriquecimiento seguido de extracción de ADN bacteriano y PCR dirigida al gen *lipL32* que permite confirmar la presencia de leptospiras patógenas^(25, 26). Es importante destacar que las técnicas de amplificación de ADN desarrolladas para detectar leptospiras a partir de muestras ambientales, incluso cuando es específica, no proporcionan información sobre la viabilidad de las bacterias en el entorno. Este punto es fundamental para evaluar el riesgo de transmisión ambiental de la enfermedad⁽²⁶⁾. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de leptospiras patógenas y no patógenas en aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa mediante el aislamiento por cultivo y la posterior identificación de las genomoespecies mediante técnicas de biología molecular.

Materiales y Métodos

Muestreo y procesamiento de las muestras: Las muestras de aguas ambientales fueron recolectadas en la zona de influencia de la ciudad de General Pico, y el noreste de la provincia de La Pampa, Argentina. Los sitios de muestreo se establecieron de manera aleatoria y fueron georreferenciados mediante un sistema de posicionamiento global (GPS). Su localización espacial varió en relación con las precipitaciones registradas en el área de estudio, dependiendo del volumen de lluvia acumulada en cada evento. El muestreo se efectuó después de los episodios de precipitación pluvial, en el período septiembre 2021–marzo 2025. Se recolectaron entre 250 a 500 mL de agua en recipientes estériles de vidrio a partir de humedales y de canales pluviales. Se incluyeron dos humedales permanentes cercanos a la ciudad de General Pico, Laguna La Arocena y Laguna RRU (Reciclado de Residuos Urbanos) que constituyen cuerpos de agua receptores de drenaje superficial urbano. Se transportaron inmediatamente al laboratorio. La temperatura se registró en los puntos de muestreo y el pH en el

laboratorio. Las muestras se clarificaron pasándolas por papel Watman N°1 y luego se filtraron a través de filtros millipore, diámetro de poro 0,22µm. Se sembró 1 mL del filtrado por duplicado en 10 mL de medio semisólido Fletcher o Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH) (Difco) con 5-fluorouracilo (200 µg/mL)⁽²⁷⁾ y Neomicina (10µL/mL)⁽²⁸⁾, preparados en nuestro laboratorio de acuerdo con la bibliografía⁽²⁹⁾. Los mismos se incubaron a 29±1°C durante 180 días, observándolos semanalmente mediante microscopía de campo oscuro.

Extracción de ADN: A partir de los aislamientos que mostraron motilidad y morfología típica del género *Leptospira* bajo microscopía de campo oscuro, se realizó la extracción de ADN utilizando un kit comercial (ADN Puriprep S-kit, Inbio Highway, Bs.As., Argentina) según las indicaciones del fabricante y los extractos se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento.

qPCR dirigida al gen *lipL32*: Para la detección de leptospiras patógenas se realizó un ensayo de PCR en tiempo real que detecta la presencia del gen *lipL32* de acuerdo con el método descrito por Villumsen et al.⁽³⁰⁾, con algunas modificaciones⁽²⁹⁾. Los cebadores amplifican un fragmento de 87 pares de bases (bp) del gen *lipL32* que codifica una lipoproteína de membrana externa presente sólo en especies patógenas de *Leptospira* (*lipL32* forward: 5'-AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCCTACTACCT-3'y *lipL32* reverse: 5'-TGGGAAAAGCAGACCAACAGA-3'). Para identificar el amplicón se utilizó una sonda de hidrólisis del tipo TaqMan con la misma secuencia de nucleótidos descrita por el autor (/56-FAM/AAGTGAAAG/ZEN/GATCTTTCGTTGC/3IABkFQ). Para la puesta a punto de la qPCR y como controles positivos se utilizaron 7 cepas de referencia cedidas por el laboratorio de diagnóstico de Leptospirosis de la Universidad Nacional de La Plata (*Leptospira interrogans* Pomona Pomona, *L. interrogans* Icterohemorrhagiae Copenhageni, *L. interrogans* Sejroe Wolffi, *L. interrogans* Sejroe Hardjo, *L. interrogans* Canicola Canicola, *Leptospira kirschneri* Grippotyphosa Grippotyphosa, *Leptospira borgpetersenii* Tarassovi Tarassovi).

PCR convencional dirigida al gen *rrs*: Luego se llevó a cabo una PCR a punto final específica de género para detectar *Leptospira*, amplificando un fragmento de 331pb del gen 16S rRNA. Se usaron los oligonucleótidos *LeptoA* (5'-GGCGGCGGTCTTAAACATG-3') y *LeptoB* (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') descritos en Mérien et al. ⁽³¹⁾ y Zarantonelli⁽³²⁾. La mezcla de reacción consistió en 5uL de buffer mix (MINT Master Mix 2x, Inbio Highway, Argentina), 0,5uL de Taq, 1,25µL de cada primer, 12 µL de H₂O y 5µL de muestra de ADN microbiano. El protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo de 3 min a 95°C seguidos de 35 ciclos de amplificación (30 s 95°C, 30s 55°C, 1 min 72°C) y un paso final a 72°C 5 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% en TAE 1X. Se usaron las cepas de referencia antes mencionadas como controles positivos.

Secuenciación del gen *rrs* e identificación de las genomoespecies de leptospiras:

Los productos de PCR amplificados se purificaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante utilizando un kit comercial (ADN PuriPrep-GP Kit, Bs.As., Argentina). Se cuantificaron los productos de PCR purificados en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (NanoDrop™ DeNovix DS-11, Termo Scientific, USA). Se acondicionaron de acuerdo con los requerimientos solicitados por la empresa (Macrogen, Seoul, South Korea) y se enviaron para su secuenciación según Sanger, en ambos sentidos, utilizando los oligonucleótidos *LeptoA* y *LeptoB* para el gen *rrs*. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Bioedit y MEGA 11. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las incluidas en la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análisis filogenético: Las secuencias se alinearon con ClustalW en Mega 11 y se ajustaron a consenso, creando un árbol de unión vecinal. Las distancias evolutivas se estimaron mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de dos parámetros de Kimura con la distribución Gamma (G) para modelar la tasa de sustitución entre sitios. El árbol de consenso *bootstrap* se infirió a partir de 1000 réplicas.

Resultados

Se procesaron 86 muestras de agua (46 de canales pluviales y 40 de humedales), desde septiembre 2021 a marzo 2025, registrándose meses con muy pocas precipitaciones, por debajo de las mínimas notificadas en los últimos años. Las precipitaciones promedio fueron de 444,1 mm.año⁻¹, siendo la máxima 638,8 mm (2021) y la mínima 498,8 mm (2023) (Datos obtenidos de <https://www.meteoblue.com>). La temperatura de las muestras positivas osciló entre 14,5 y 30°C y el pH entre 6 y 8. Se recuperaron espiroquetas en el 10,5% (n=9) de las muestras, en el 13% de muestras de canales pluviales y en el 7,5% de las muestras de humedales. En la fotografía 1 se observa el desarrollo característico de esta bacteria en medios semisólidos o “zona de Dinger”. Todas las espiroquetas recuperadas pertenecen al género *Leptospira*. La imagen del gel de agarosa con los productos de PCR luego de la amplificación del gen *rrs* se muestra en la Figura 1. Ninguna de las cepas recuperadas presentó el gen *lipL32* característico de las especies patógenas. Las secuencias obtenidas luego de ser comparadas con las incluidas en la base de datos BLAST determinaron las siguientes genomoespecies: *Leptospira ellinghausenii*/*Leptospira yanagawae*/*Leptospira.meyeri* (n=5), *Leptospira idonii* (n=2), *Leptospira vanthielii* (n=1), *Leptospira fainei* (n=1) (Cuadro 1).

EL análisis filogenético (Figura 2) realizado sobre el alineamiento de las secuencias *rrs* obtenidas en este estudio y secuencias de diferentes cepas del género *Leptospira*, pudieron respaldar la estrecha relación con las especies identificadas. Se seleccionaron las mismas regiones del gen *rrs* de las genomoespecies representativas de los subclados

patógenas (P1, P2) y saprofitas (S1 y S2) teniendo en cuenta el porcentaje de identidad, cuyas secuencias fueron obtenidas de GenBank.

Cuadro 1: Identificación de espiroquetas aisladas a partir de aguas ambientales por secuenciación parcial del gen 16S rARN.

ID	origen	Especie (% de identidad)	Grupo
1	canal	<i>Leptospira ellinghausenii/ Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri (95%)</i>	Saprófita (S1)
22	humedal	<i>Leptospira ellinghausenii/ Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri (99,7%)</i>	Saprofita (S1)
25	humedal	<i>Leptospira idonii (97%)</i>	Saprofita (S2)
28	canal	<i>Leptospira ellinghausenii/ Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri (100%)</i>	Saprofita (S1)
29	canal	<i>Leptospira ellinghausenii/ Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri (99,3%)</i>	Saprofita (S1)
30	Laguna RRU	<i>Leptospira idonii (93%)</i>	Saprofita (S2)
37	canal	<i>Leptospira ellinghausenii/ Leptospira yanagawae/Leptospira meyeri (100%)</i>	Saprofita (S1)
44	canal	<i>Leptospira fainei (94,7%)</i>	Patógena intermedia (P2)
59	canal	<i>Leptospira vanthielii (100%)</i>	Saprofita (S1)

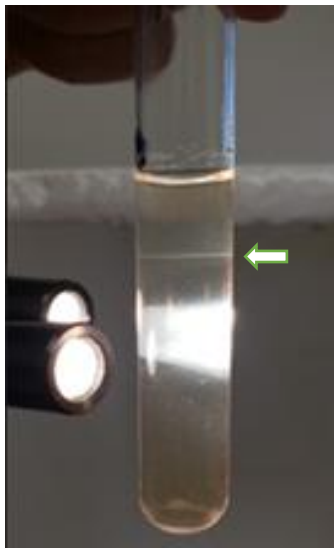


Foto1: Desarrollo de leptospiras en medio Flecher con 5FU. Después de una semana de incubación a 28°C. La flecha indica la “zona de Dinger”

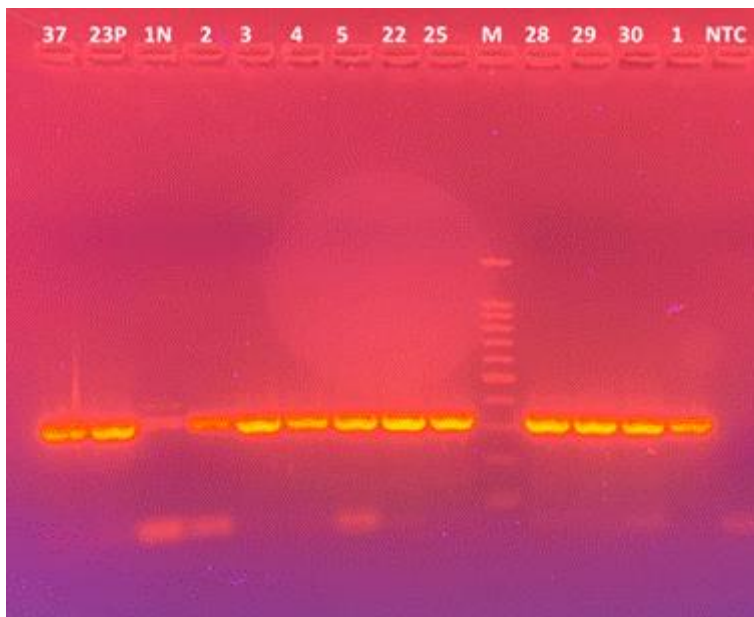


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa para la detección del gen 16Sr ARN. 5 μ L del producto de PCR se sometió a electroforesis horizontal en agarosa al 1,5% y Buffer TAE (Tris acético EDTA) con bromuro de etidio (0,5 μ L/mL). Las bandas de 331pb se visualizaron mediante exposición del gel en un transiluminador de luz UV. Producto de PCR de cepas aisladas: 37, 22, 25, 28, 29, 30, 1. Producto de PCR de cepas de referencia de leptospiras (Controles positivos): 23P, 2, 3, 4, 5, 1N. NTC: control negativo. M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Byodinamics, Argentina).

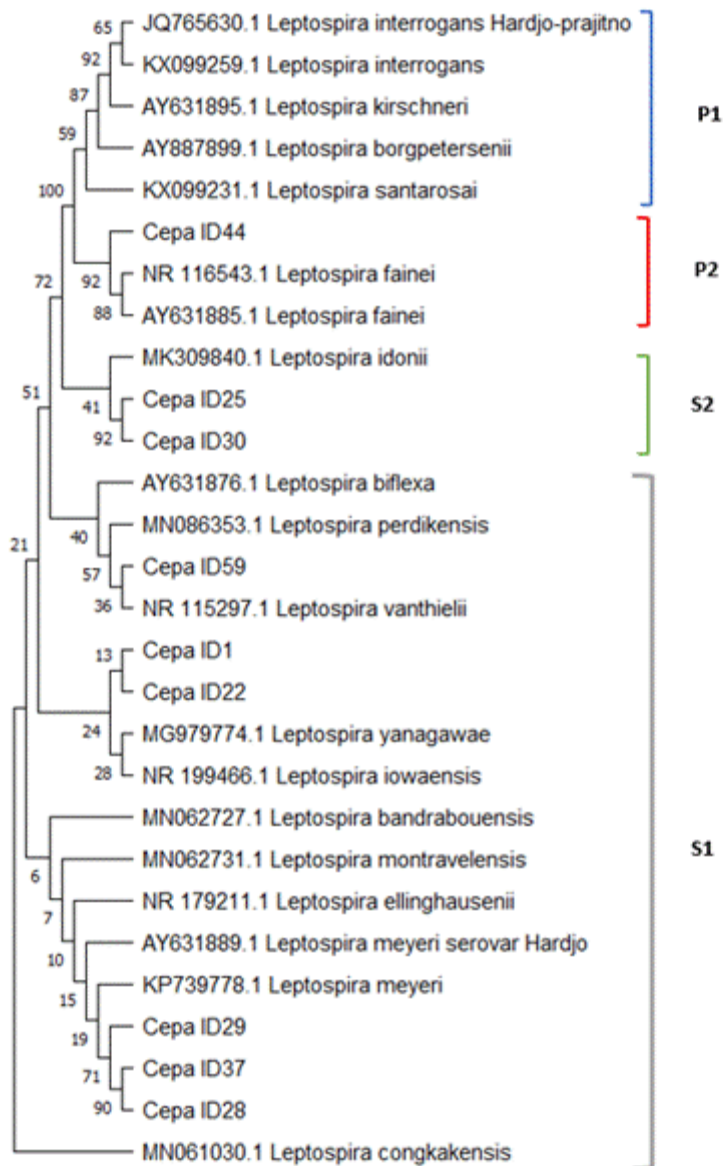


Figura 2: Análisis Neighbor-joining de la secuencia parcial del gen 16S rARN. Se utilizaron las secuencias obtenidas a partir de las espiroquetas aisladas y de especies de leptospiras seleccionadas de acuerdo al mayor porcentaje de identidad y otras referentes de los grupos patógenas (P1 y P2) y saprófitas (S1 y S2), extraídas de GenBank. El dendrograma se construyó mediante el método de Neighbor-joining utilizando MEGA 11. El modelo evolutivo utilizado fue la distancia de Kimura de 2 parámetros (K2P) con la distribución Gamma (G) para modelar la tasa de sustitución entre sitios. El árbol de consenso bootstrap se infirió a partir de 1000 réplicas.

Discusión

La leptospirosis presenta un patrón estacional, con una mayor incidencia durante el verano y el otoño en regiones templadas. La temperatura desempeña un papel fundamental en la supervivencia de las bacterias⁽³³⁾, y el contacto prolongado con aguas de inundaciones constituye el principal factor de riesgo individual en nuestro país⁽³⁴⁾. Se ha determinado que las especies de leptospiras saprofitas crecen entre 1°C y 35°C, las especies intermedias entre 1°C a 37°C y las patógenas de 20°C a 37°C⁽³⁵⁾. Si bien influyen otros factores, en nuestro estudio se aislaron leptospiras en las muestras con temperaturas entre 14,5°C y 30°C.

Como ya mencionamos, nuestra región, ubicada en el este de la provincia de La Pampa, corresponde a un área climáticamente propensa a inundaciones asociadas a precipitaciones intensas, aunque el desvío porcentual de las lluvias varía de un año a otro. Por ejemplo, en 2017, según datos del Servicio Meteorológico Nacional, se registraron precipitaciones superiores a los 800 mm que, junto con un final de invierno excepcionalmente lluvioso, ocasionaron anegamientos e inundaciones. En contraste, durante el período 2021–2024, que comprende el presente estudio, las precipitaciones promedio fueron de 444,1 mm·año⁻¹, valores que impactaron negativamente en el número de muestras esperadas. Gran parte del este de Argentina fue afectado por condiciones de sequía moderada a severa durante la primera mitad del 2023, culminó con una escasez de lluvias sin precedentes que también afectó la provincia de La Pampa⁽³⁶⁾. Según el Boletín Epidemiológico Nacional (N°747, SE 10)⁽³⁷⁾ en la provincia de La Pampa, durante el período 2020–2024 se confirmaron 15 casos, de un total de 110 notificados, mientras que sólo en el 2018 se notificaron 16 casos, de los cuales 9 fueron sospechosos, 2 confirmados.

Recuperar leptospiras patógenas del ambiente es un gran desafío, ya que estas espiroquetas son bacterias sensibles y exigentes, de crecimiento lento con requisitos específicos. Sin embargo, en estudios anteriores se han aislado leptospiras patógenas de muestras ambientales^(26, 27). Dado que las especies saprófitas, habitantes comunes del ambiente, son abundantes y crecen más rápido, son las más frecuentemente aisladas de muestras de suelo y agua^(26, 38). Algunos estudios han confirmado que las leptospiras patógenas pueden sobrevivir y permanecer virulentas durante varias semanas en el agua y el suelo. La capacidad de supervivencia ambiental depende de la especie y la cepa⁽²⁶⁾. En este trabajo solo hemos aislado leptospiras saprófitas y una cepa relacionada a especies de patogenicidad intermedia.

En la actualidad, para el aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras ambientales se recomienda la filtración previa mediante membranas de 0,45 µm, seguida del empleo de combinaciones selectivas de antibióticos como la formulación STAFF (sulfametoxazol, trimetoprim, anfotericina B, fosfomicina y 5-fluorouracilo)^(3, 22, 39), diseñada para reducir la proliferación de la microbiota acompañante. Si bien esta estrategia ha demostrado mejorar la recuperación de cepas en entornos altamente contaminados, su implementación puede verse limitada por la disponibilidad y el costo de los insumos. No obstante, estudios previos han logrado aislar leptospiras patógenas utilizando

metodologías de enriquecimiento y selección similares a las empleadas en el presente trabajo^(26, 27), lo que sugiere que la recuperación exitosa depende no solo del esquema antibiótico utilizado, sino también de las características intrínsecas de la muestra y de la carga bacteriana inicial^(39, 40, 41). Por otra parte, la incorporación de etapas de filtración en muestras ambientales con elevada turbidez puede generar obstrucción de las membranas debido a las propiedades fisicoquímicas del agua, el incremento de sólidos en suspensión y la presencia de carbono orgánico y otros nutrientes disueltos, factores que podrían afectar la eficiencia del procedimiento y la viabilidad bacteriana.

Es importante destacar que las dos clasificaciones del género *Leptospira* —la genotípica (basada en secuencias de ADN) y la serológica (basada en la estructura antigénica del lipopolisacárido)— son independientes y no presentan una correspondencia directa. Las especies definidas por criterios moleculares no se correlacionan necesariamente con los serovares establecidos por métodos fenotípicos. En la bibliografía^(2, 42) se describe que dentro de una misma genomoespecie puede haber serovares patógenos y no patógenos, o el mismo serovar puede estar presente en distintas especies genéticas. Entonces, la completa caracterización de un aislamiento de *Leptospira* implica la identificación a nivel de genomoespecie y serovar⁽²⁾. Es así como la especie identificada por secuenciación del gen 16SrRNA, *Leptospira meyeri*, pertenece al grupo filogenético de las leptospirosas saprofitas⁽⁴³⁾. Sin embargo, estudios previos han reportado que *L. meyeri* está compuesta por cepas con diferente potencial patógeno^(42, 44), por lo que su clasificación ha sido controvertida y podría causar enfermedades. En nuestro país se ha detectado en el suero de dos pacientes fallecidos de leptospirosis de la provincia de Santa Fe⁽⁴⁵⁾. Trabajos recientes sugieren firmemente niveles de virulencia muy distintos dentro de las genomoespecies^(24, 46, 47), y por ello la detección molecular en muestras ambientales debe ir seguida de la tipificación⁽²⁴⁾ e interpretarse con cautela hasta la utilización de métodos validados de detección específicos de virulencia⁽⁴⁷⁾. Los estudios más recientes utilizan técnicas de última generación,^(6, 39) las cuales incluso han dado lugar a estudios que informan sobre la identificación de nuevas especies de *Leptospiras* del medio ambiente.

Las leptospirosas recuperadas en este estudio, particularmente las cepas 1, 22, 28, 29 y 37, requieren una caracterización adicional que permita determinar con mayor precisión su genotipo y su serovar, dado que la identificación basada únicamente en la secuenciación parcial del gen *rrs* no resulta suficiente para establecer su verdadero potencial epidemiológico. Esta limitación adquiere especial relevancia en el contexto de la complejidad taxonómica del género *Leptospira*, donde especies filogenéticamente próximas pueden diferir sustancialmente en su comportamiento patógeno. En este sentido, en Argentina se han aislado especies de patogenicidad intermedia, como *Leptospira wolffii* y *Leptospira broomii*, a partir de pacientes sintomáticos⁽⁴⁵⁾, lo que demuestra que las leptospirosas clasificadas dentro de este grupo pueden participar en la infección humana. Bajo esta perspectiva, la recuperación en nuestro estudio de una cepa identificada como *Leptospira fainei* reviste particular interés. Esta especie ha sido asociada con casos de leptospirosis humana⁽⁴⁸⁾ y se ha descrito su localización en el tracto

reproductivo de jabalíes y cerdos domésticos⁽⁴⁹⁾, lo que sugiere posibles ciclos de transmisión vinculados a reservorios silvestres y productivos. Asimismo, estudios recientes han detectado anticuerpos contra *L. fainei* serovar Hurstbridge en el 8% de jabalíes seropositivos⁽⁵⁰⁾, respaldando su circulación en poblaciones animales.

Conclusiones

Si bien el muestreo se llevó a cabo durante un período de bajas precipitaciones para nuestra región, fue posible recuperar leptospiras a partir de aguas ambientales. Resulta necesario futuras investigaciones que permitan profundizar en el conocimiento de la supervivencia, persistencia y multiplicación de *Leptospira* en ambientes fluviales. Asimismo, y de acuerdo con la bibliografía consultada^(3, 6) es fundamental aplicar técnicas moleculares de última generación en conjunto con la determinación del serovar para poder identificar correctamente a las espiroquetas aisladas de aguas superficiales y así estimar su potencial riesgo para la salud humana y animal.

Bibliografía

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14(2):296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
2. Levett PN. Systematics of Leptospiraceae. En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 11-20. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015; 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
3. Hamond C. et al Isolation and characterization of saprophytic and pathogenic strains of *Leptospira* from water sources in the Midwestern United States. *Front Water.* 2024. 6:1278088. Disponible en <https://doi.org/10.3389/frwa.2024.1278088>
4. Ahmed N et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006. 5, 28. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
5. Vincent AT. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019.23;13(5), e0007270. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
6. Bradley EA, Lockaby G. Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2023. 12(9), 1167. Disponible en <https://doi.org/10.3390/pathogens12091167>
7. Asociación Argentina De Veterinarios De Laboratorio (AAVLD) 2017. Informe sobre Leptospirosis. Comisión Científica de leptospirosis. <http://www.aavld.org.ar/documentos/6-INFORME%20SOBRE%20LEPTOSPIROSIS%20%202016.pdf>
8. Sadler E, Vallee E, Watts J, Wada M. The effects of rain and flooding on leptospirosis incidence in sheep and cattle in New Zealand. *New Zealand Vet J*, 2025. 1–13. Disponible en <https://doi.org/10.1080/00480169.2025.2540324>
9. Muñoz-Zanzi C, Mason MR, Encina C, Astroza A, Romero A. *Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. *Int J Environ Res Public Health.* 2014.11:6666–80. Disponible en <https://doi.org/10.3390/ijerph110706666>
10. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 2011. 17(4):494-501. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>
11. Licoff N, Koval A, López S, Margueritte J, Mejía M. Brote de leptospirosis en feed lot: descripción del caso, confirmación diagnóstica y medidas de control implementadas. *Vet Arg.* 2008. 25(250):749-755
12. Koziol EE, Moliner AI, Vanasco NB, Scala MR, Signorini M, Tarabla H. Conocimiento de zoonosis en operarios tamberos de la provincia de Santa Fe, Argentina. In *Vet.* 2016.18(1): 45-52.

13. Koval A, López S, Lagioia G, Bertino R, Romera MR, Scialfa E. Brote de leptospirosis en bovinos y humanos en un tambo de Lincoln, Provincia de Buenos Aires. Vet. Arg.2017, 34(355).
14. Koval AA, Brihuega BF, Loffler SG, López S, Martin MS, Lagioia GG, Insaugarat JR. Primer aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo Bovis a partir de un caso clínico en Argentina. Rev Argent Microbiol. 2020, 52(3), 61-70. Disponible en: https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412020000300061&lng=es.
15. Vanasco B, Benegas L, Uboldi A, Lanzotti M, Flynn L, Sardi F, Rodríguez Alassia P. 2016. Capítulo de Leptospirosis en: Consenso Sobre Enfermedades Infecciosas Regionales En La Argentina Recomendaciones de la Sociedad Argentina de Pediatría- Comité Nacional de Infectología. http://www.anlis.gov.ar/iner/?page_id=1193
16. Heydari P, Tirbandpay M, Ghasemishayan R. Systematic review of the prevalence of environmental and host-related risk factors and the zoonotic potential of leptospirosis in domestic dogs in regions impacted by environmental changes. BMC Vet Res, 2025. 21(1), 564. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s12917-025-05023-0>
17. Rajaonarivelo JA et al. Leptospira prevalence and lineages vary across land-use types due to shifts in small mammal communities. Appl Environ Microbiol. 2026. e0206125. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/aem.02061-25>
18. Colombo VC, Gamieta I, GruneLoffler S, Brihuega B, Beldomenico PM. New host species for *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Vet Microbiol. 2018. 215:90-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.007>
19. Kin MS, Brihuega B, Fort M, Delgado F, Bedotti D, Casanave EB. Presence of antibodies against *Leptospira* serovars in *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae), La Pampa province, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2015, 47(1):41-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.01.005>
20. Kin MS et al. First record of the presence of antibodies against *Leptospira* in *Lagostomus maximus*, and *Leptospira weillii* serogroup Celledoni in *Chaetophractus villosus*, Argentina. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2025. 117,102302. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2025.102302>
21. Yanagihara Y et al. *Leptospira* Is an Environmental Bacterium That Grows in Waterlogged Soil. Microbiol. Spectr. 2022, 10, e02157-21 Disponible en <https://doi.org/10.1128/spectrum.02157-21>
22. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SY, Saito M, Gloriani NG, Si Y. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. Microbiol Immunol. 2011.55, 494-501. Disponible en: doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x

23. Zulkifli NF, Wan SJ, Neela VK, Chee HY, Masri SN, et al. Detection of *Leptospira* Species in Environmental Samples by Amplification of 16S rRNA and rpo β Genes. *Sains Malaysiana* 2018. 47: 1795– 1800.
24. Thibeaux R et al. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol.* 2018 9:816. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2018.00816
25. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005, 54: 45–49. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>
26. Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupe´- Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE.* 2020. 15(1): e0227055. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>
27. Francois BS, Brihuega FB, Grune LS, Gattarello MV, Correa PD, Petrakovsky MJ, Gualtieri SC, Arestegui LM. Isolation of *Leptospira borgpetersenii* in water sources in Argentina. *Rev Cubana Med Trop.* 2013;65(2):177-184.
28. Grune Löffler S et al. Detección de *Leptospira* spp. (Spirochaetales: Leptospiraceae) en muestras ambientales de regiones habitadas por poblaciones vulnerables del norte argentino. *Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias,* 2021. 20(2), 91-96. Disponible en <https://doi.org/https://doi.org/10.14409/favecv.v20i2.10119>
29. Martin LP. Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. 2018. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
30. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods.* 2012.91(1):184-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.009>
31. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992.30(9):2219–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2219-2224.1992>
32. Zarantonelli L 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(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>.
33. Jacob P, Chiani Y, Schmeling MF, Landolt N, Pujato N, Vanasco B. Leptospirosis humana en Argentina: un esquema de análisis, 2014. *Rev Argent Salud Pública.*2017;8(32):13-8. Disponible en: <https://rasp.msal.gov.ar/index.php/rasp/article/view/114>
34. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical Characteristics and Risk Factors of Human Leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop.* 2008;107(3):255-8

35. Samrot AV, Sean TC, Bhavya KS, Sahithya CS, Chan-draseskaran S, Palanisamy R, Robinson ER, Subbiah SK, Mok PL. Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis—A Review. *Pathogens* 2021, 10, 145. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
36. Servicio meteorológico Nacional. Boletín Climatológico Anual (2023) <https://ws2.smn.gob.ar/boletines/bolet%C3%ADn-climatol%C3%B3gico-anual-2023>
37. Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología. (2025). Boletín Epidemiológico Nacional N°747, SE 10.
38. Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P, Rivero M. Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50: 323–326. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.003>
39. Gorman M, Xu R, Prakoso D, Salvador LCM, Rajeev S. *Leptospira* enrichment culture followed by ONT metagenomic sequencing allows better detection of *Leptospira* presence and diversity in water and soil samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 16(10): e0010589. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010589>
40. Narkkul U et al. Optimization of Culture Protocols to Isolate *Leptospira* spp. from Environmental Water, Field Investigation, and Identification of Factors Associated with the Presence of *Leptospira* spp. in the Environment. *Trop Med Infect Dis*. 2020, 5, 94. Disponible en : <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020094>
41. Kaboosi H, Razavi MR. Efficiency of Filtration Technique for Isolation of *Leptospira* spp. from Surface Waters: Role of Different Membranes with Different Pore Size and Materials. *Afr J Microbiol Res*. 2010, 4, 671–676. 78.
42. Bharti AR, et al. Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003. 3 (12): 757-71. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
43. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol.*, 1987, p. 407-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407>
44. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol*. 2000. 151,333–341. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00156-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00156-X)
45. Chiani Y et al. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol*. 2016;37:245-51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033>
46. Xu Y et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep* 6. 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep20020>

47. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospiral Pathogenomics. *Pathogens*. 2014; 3(2):280-308. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pathogens3020280>
48. Petersen AM, Boye K, Blom J, Schlichting P, Krogfelt KA. First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome. *J Med Microbiol*. 2001;50(1):96-100. doi: 10.1099/0022-1317-50-1-96.
49. Perolat P et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol*. 1998. 48 Pt 3:851-8. doi: 10.1099/00207713-48-3-851.
50. Stagnoli A, House RV, Hagemann J, Dohmann K, Pfeffer M, Albrecht C. Seroprevalence of 16 *Leptospira* Serovars in Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Saxony-Anhalt, Germany. *Animals (Basel)*. 2025.18;15(18):2725. <https://doi.org/10.3390/ani15182725>

Conflictos de intereses: Los autores declaran por escrito, que no existen conflictos de intereses.

CRediT

Todos los autores contribuyeron a la concepción y al diseño del estudio, así como a la toma de muestras. La preparación del material, el procesamiento de las muestras, la siembra y seguimiento de los cultivos fueron realizados por Andrea Belén Schenheiter, Marisa Etel Gimenez, Ana Inés Portu y Claudia Andrea Tortone. La estandarización y puesta a punto de las técnicas de biología molecular fueron supervisadas por Ana Inés Portu y Franco Exequiel Lucero Arteaga. Asimismo, todos los autores participaron en el desarrollo de la metodología y el análisis de los datos. El primer borrador del manuscrito fue redactado por Claudia Andrea Tortone, y todos los autores realizaron comentarios sobre las versiones previas del manuscrito. Finalmente, todos los autores leyeron y aprobaron la versión final.