

Identificación de leptospiras recuperadas a partir de ecosistemas acuáticos del noreste de La Pampa utilizando una técnica de qPCR para cepas patógenas

Schenheiter, A.¹; Tortone, C.A.¹; Portu, A.I.¹; Staskevich, A.S.¹; Martín, L.P.¹; Franco Lucero Arteaga, F.¹ y Oriani, D.S.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, calle 5 esquina 116, General Pico, La Pampa. ctortone@yahoo.com.ar

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad considerada una zoonosis de gran distribución en el mundo, la cual se adquiere por transmisión directa e indirecta a través de la orina de animales silvestres y domésticos infectados con espiroquetas del género *Leptospira*. Aunque las actividades asociadas con las ocupaciones rurales son factores de riesgo significativos, el contacto prolongado con el agua en las inundaciones es el riesgo individual más importante en nuestro país. Nuestra región es un área climática propensa a ellas por precipitaciones abundantes, aunque el desvío porcentual de precipitaciones varía año a año. La asociación entre el contacto con el agua ambiental y el riesgo de infección en climas templados no está totalmente claro. Los problemas de diagnóstico y la falta de un monitoreo sistemático y adecuado de la leptospirosis pueden dar como resultado un conocimiento incompleto sobre su prevalencia y subestimación del riesgo real relacionado con su propagación. Tampoco se conoce el verdadero rol que cumplen las especies de leptospiras intermedias en los animales y el hombre, un grupo transicional entre las especies patógenas y saprófitas, poco estudiadas en nuestro país. El objetivo de nuestro trabajo es determinar la presencia de leptospiras en aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa e identificarlas a nivel de especie. En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos. Se procesaron 37 muestras de agua recolectadas de canales pluviales y humedales luego de precipitaciones, durante el periodo de septiembre de 2021 a marzo de 2022. Los puntos de muestreo fueron geolocalizados. Se prefiltraron 500 mL de cada muestra utilizando papel de filtro Whatman N°1. Posteriormente se filtraron a través de una membrana estéril de 0,22 µm de diámetro de poro. Un mililitro de agua filtrada se inoculó en medio Fletcher, preparados en nuestro laboratorio, adicionados con 5-fluorouracilo (200 µg/mL). Los tubos sembrados se incubaron a 28-30 °C durante 180 días, observándolos semanalmente mediante microscopía de campo oscuro. A partir de cada cultivo presuntivo positivo se realizó la extracción de ADN utilizando un kit (ADN Puriprep S-kit, Inbio Highway, Bs.As., Argentina) según las indicaciones del fabricante. El DNA de cada cepa se conservó a -20 °C hasta su procesamiento. Para la detección de *Leptospira* patógenas, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real que detecta la presencia del gen *lipL32* el cual no está presente en especies no patógenas.



Se utilizaron los primers LipL32F: 5'-AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCCTACTACCT-3' y LipL32R: 5'-TGGGAAAAGCAGACCAACAGA-3'. El protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo de 3 min a 95 °C seguido de 39 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 13 s a 60 °C, 11s a 72°C). Se utilizaron como controles positivos 6 cepas de referencia. En el 16,3% de las muestras se observaron espiroquetas compatibles con leptospiras, 40% (4/10) de las mismas correspondieron a canales pluviales y 7,4% (2/ 27) a humedales. Ninguna de las espiroquetas recuperadas fue detectada como leptospiras patógenas. Para confirmar si son *Leptospira* se debe realizar un ensayo de PCR convencional específico de género dirigido al gen *rrs* y su posterior secuenciación para la identificación final.

Palabras clave: *Leptospira* patógenas, ecosistemas acuáticos, qPCR, climas templados.

Identification of isolates of *Leptospira* recovered from aquatic ecosystems of northeast of La Pampa using a qPCR technique for pathogenic strains

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease considered a zoonosis with a wide distribution in the world, which is acquired by direct and indirect transmission through the urine of wild and domestic animals infected with spirochetes of genus *Leptospira*. Although the activities associated with rural occupations are significant risk factors, prolonged contact with water in floods is the single most important risk in our country. Our region is a climatic area prone to them due to abundant rainfall, although the percentage deviation of rainfall varies from year to year. The association between contact with ambient water and the risk of infection in temperate climates is not entirely clear. Diagnostic problems and lack of systematic and adequate monitoring of leptospirosis can result in incomplete knowledge about its prevalence and underestimation of the real risk related to its propagation. The true role played by intermediate pathogenic *Leptospira* species in animals and man, a transitional group between pathogenic and saprophytic species, little studied in our country, is also unknown. The aim of our work is to determine the presence of *Leptospira* in environmental waters of the northeast region of the province of La Pampa and identify them at the species level. In this work are presented the first results obtained. 37 water samples were processed, which were collected from rainwater channels and wetlands after rainfall, during the period from September 2021 to March 2022. The sampling points were geolocated. After prefiltering 500 ml of each sample with Whatman No. 1 filter paper, they were filtered through a 0.22 µm pore diameter sterile membrane. One milliliter of filtered water was inoculated in Fletcher's medium, prepared in our laboratory, added with 5-fluorouracil (200 µg/mL). The seeded tubes were incubated at 28-30 °C for 180 days, observing them weekly by means of dark field microscopy. DNA extraction was performed from each presumptive positive culture using a kit (DNA Puriprep S-kit, Inbio Highway, Bs.As., Argentina) according to the manufacturer's instructions. The DNA of each strain was stored at -20 °C until processing. For the detection of pathogenic *Leptospira*, a real-time PCR assay was performed that detects the presence of the *lipL32* gene, which is not present in non-pathogenic *Leptospira* species. Primers LipL32F: 5'-



AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCT-3' and LipL32R: 5'-TGGGAAAAGCAGACCAACAGA-3 were used. The amplification protocol consisted of 1 cycle of 3 min at 95 °C followed by 39 cycles of amplification (30 s at 95 °C, 13 s at 60 °C, 11 s at 72 °C). Six reference strains were used as positive controls. Spirochetes compatible with *Leptospira* strains were observed in 16.3% of the samples, 40% (4/10) corresponded to pluvial canals and 7.4% (2/27) to wetlands. None of the recovered spirochetes was detected as a pathogenic strain. To confirm whether they are *Leptospira*, a conventional genus-specific PCR assay directed at the *rrs* gene must be performed, followed by sequencing for the final identification.

Keywords: Pathogenic *Leptospira*, aquatic ecosystems, qPCR, temperate climates.

