

## Aislamiento de *Leptospira interrogans* serogrupo Sejroe a partir de orina de vaquillona abortada.

Vet. Arg. ? Vol. XXVI ? N° 258 ? Octubre 2009.

Laphitzondo, D.\*\*\*; Villa, C.\*\*; Margueritte, J.\*; López, S.\*; Koval, A.\*

### Resumen.

Se describe el aislamiento de una cepa de *Leptospira interrogans* serogrupo Sejroe a partir de orina de vaquillona abortada, perteneciente a un rodeo de cría con elevadas pérdidas tacto-parición. Los resultados de la tipificación parcial del microorganismo aislado, difieren significativamente de otros aislamientos, pertenecientes a cepas del serogrupo Pomona, efectuados y descritos en los últimos años por los autores (1-2). Además se observó que el microorganismo tuvo dificultad para crecer en los medios de cultivo habituales y que la inoculación experimental en hámster resultó negativa.

Palabras clave: *Leptospira interrogans*. Aislamiento. Tipificación.

### Isolation of *Leptospira interrogans* serogrupo Sejroe from urine of an aborted heifer.

Summary.

Description of an isolation of *Leptospira interrogans* serogroup Sejroe from urine of an aborted heifer belonging to a breeding herd with high losses pregnancy-parturition. Results of partial typing of the isolated microorganism significantly differed from those of other isolates, belonging to strains of the Pomona serogroup, obtained and described previously by the authors. In addition it was observed that the microorganism had difficulties to grow in standard culture media and that experimental inoculation in hamster was negative.

Key words: *Leptospira interrogans*. Isolation. Typing.

\*\*\* Med. Vet. asesor actividad privada.

\*\* Laboratorio Villa.

\* Biogénesis-Bagó S.A.

*Dedicado a la memoria del Dr. Javier Margueritte*

### Introducción.

Los aislamientos de *Leptospira* que se efectúan año a año en nuestro medio a partir de muestras de origen bovino son relativamente escasos (3). Son conocidas y ampliamente descritas las dificultades para aislar este microorganismo, tales como la obtención de muestras adecuadas y su correcta remisión a laboratorios especializados, que también son escasos y cuya ubicación geográfica dificulta el envío de material de numerosas zonas ganaderas de nuestro País.

En algunas ocasiones se arriba al diagnóstico en base a la experiencia y observaciones clínicas del profesional de campo, avalado por serología positiva, y, en el mejor de los casos, acompañada por una inmunofluorescencia positiva confirmatoria.

Estas herramientas permiten confirmar un diagnóstico de leptospirosis y tomar decisiones que previenen en muchos casos pérdidas económicas importantes.

Pese a estas ventajas, los análisis efectuados no resultan suficientes para establecer el serovar actuante, ni recuperar las cepas para su posterior estudio y tipificación.

En este caso en particular, el aislamiento de una cepa del serogrupo Sejroe, al que pertenece el serovar *harjo*, y sus tipos Hardjobovis y Hardjoprajitno, nos enfrenta a un nuevo desafío diagnóstico.

Si bien existen publicaciones de aislamientos locales del serovar *hardjo* a partir de riñones de bovinos y equinos, los mismos se remontan a mediados de los años 70 (4-5). El hecho de que los mismos fueron efectuados a partir de muestras obtenidas en matadero, y no a partir de muestras asociadas a un problema clínico, relativizó su importancia.

La falta de aislamientos posteriores a partir de muestras clínicas, pese a una elevada tasa de serología positiva al serovar *wolffi* (serológicamente similar a *hardjo*), impidió conocer la real situación del serovar *hardjo* en nuestro País. Mientras tanto, estudios en el resto del mundo, indicaban que la infección por Hardjobovis se transformaba en la causa de leptospirosis bovina más difundida (6-7-8-9-10-11-12).

El advenimiento de la biología molecular permitió establecer diferencias genéticas entre los tipos hardjobovis (predominante en USA y descrito en varias regiones ganaderas del mundo) y hardjoprajitno (prevalente en Reino Unido), serológicamente indistinguibles utilizando la metodología de clasificación taxonómica clásica (11).

Cuál es la situación de nuestro país respecto a este tema<-: hoy la desconocemos.

Describimos el cuadro clínico, los métodos de diagnóstico utilizados, las dificultades presentadas para aislar esta cepa y las diferencias encontradas con otras cepas de aislamientos anteriores. No disponemos en los Laboratorios de Referencia de nuestro País de la metodología para efectuar la genotipificación.

Insistimos en la necesidad de aislar, preservar y tipificar cepas salvajes de *Leptospira*, pilar para profundizar en el conocimiento epidemiológico, mejorar las técnicas de diagnóstico y contribuir al desarrollo de vacunas cada vez más eficaces.

## **Materiales y métodos.**

Descripción del cuadro clínico:

### **Características del establecimiento:**

Se encuentra ubicado en General Paunero, al S.O. de la Pcia. de Córdoba, próximo al límite con San Luis. Posee suelo arenoso con partes planas destinadas a agricultura, y partes medanosas con predominio de bosque de chañar, encontrándose en situación de sequía.

El rodeo se encuentra libre de brucelosis y de enfermedades venéreas.

## **Parámetros reproductivos.**

El diagnóstico de gestación efectuado en abril de 2008 dio un promedio general de 92 % de preñez, sobre un total de 1228 animales. Al momento del tacto se detectan 5 animales con cuadro de aborto reciente, que se eliminaron con el lote de vacas vacías. El rodeo más afectado fue el de vaquillonas de primer servicio (entore de 15 meses, n = 161), con un 61 % de pérdidas tacto-parición.

El promedio de pérdidas sobre el rodeo general fue de 19 %.

## **Muestras para análisis de laboratorio.**

Se remitieron al laboratorio 23 sueros para diagnóstico de causal de aborto. Los resultados para brucelosis y neospora fueron negativos. Se verificaron títulos por ELISA para IBR y DVB en aproximadamente la mitad de los animales. La serología para *Leptospira* por microaglutinación resultó negativa para el serovar *pomona* y 16/23 sueros resultaron positivos frente a *wolffi*, con títulos comprendidos entre 1:200 y 1:800.

En base a estos datos se decidió remitir al Médico Veterinario responsable del establecimiento medio de transporte para intentar el aislamiento de leptospiras a partir de orina.

## **Extracción de orina.**

Se extrajeron 9 muestras de orina mediante aplicación de diurético (furosemida, dosis indicada por el elaborador 13). Como medio de transporte se utilizó EMJH líquido, diluyendo aproximadamente 10-20 mL de orina en 150 mL de medio.

## Examen directo.

Las muestras de orina se observaron en microscopio de campo oscuro para evaluar presencia de leptospiras y grado de contaminación de las mismas.

## Siembra para cultivo.

Se filtraron las muestras de orina por 0.45 µm para retener la mayoría de microorganismos contaminantes. Se sembraron 2 mL de orina filtrada en 1 tubo con 20 mL de medio semisólido de Fletcher y 2 mL en otro tubo con medio EMJH líquido. A partir de los mismos se efectuaron 2 diluciones en base 10 en los mismos medios, quedando diluciones finales de 1:10, 1:100 y 1:1000. Los tubos sembrados se incubaron a 28-30 ° C durante 4 meses, con observaciones semanales para verificar desarrollo.

## Inoculación experimental.

Se inocularon 2 hámsteres con 1 mL de cada orina no filtrada por vía intraperitoneal. Transcurridos 21 días desde la inoculación, y no verificándose muerte o sintomatología en los animales, los mismos fueron sacrificados con dióxido de carbono y el riñón derecho de cada uno sembrado según metodología previamente descripta(1-2).

### Resultados:

#### Examen Directo:

Las 9 muestras de orina se observaron en microscopio de campo oscuro, resultando una de ellas positiva, con muy baja carga de leptospiras (una leptospira cada 30-40 campos microscópicos observados).

La contaminación de las muestras resultó baja al momento de la observación y posterior siembra.

#### Cultivo:

Se aisló *Leptospira* spp. de la muestra que había resultado positiva al examen directo, solamente en la dilución 1:10 en medio semisólido de Fletcher. No se aisló en las diluciones 1:100 y 1:1000 del mismo medio, ni tampoco en EMJH.

Las restantes ocho muestras de orina resultaron negativas.

El microorganismo resultó muy fastidioso para crecer y solo se evidenció desarrollo después de un mes de efectuada la siembra.

También resultó bastante dificultosa la adaptación a medio EMJH líquido, que demandó

aproximadamente seis semanas, para poder efectuar la tipificación hasta nivel de serogrupo.

### Inoculación Experimental:

Las muestras inoculadas no produjeron muerte ni sintomatología en los hámsteres y el cultivo de los respectivos riñones resultó negativo.

### Tipificación:

Las cepa aislada se enfrentó a sueros de referencia de los serovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *pomona*, *wolffi* y *hardjo*.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

Sueros	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
canicola	?	?	?	?	?	?	?	?
icterohaemorrhagiae	?	?	?	?	?	?	?	?
grippotyphosa	?	?	?	?	?	?	?	?
pomona	?	?	?	?	?	?	?	?
wolffi	+	+	+	+	+	+	+	?
hardjo	+	+	+	+	+	+	+	+

Se concluye que la cepa aislada pertenece al serogrupo Sejroe, en el que están incluidos los serovares *wolffi* y *hardjo*.

### Conclusiones.

En base a la información obtenida no podemos establecer el grado de implicancia de la cepa aislada en el cuadro de pérdidas reproductivas descrito, ya que pueden estar participando en forma conjunta otros agentes infecciosos y/o no infecciosos.

Sin embargo, este aislamiento confirma la presencia en el rodeo de un agente etiológico capaz de provocar diferencias tacto-parición, que ha sido descrito en muchas regiones ganaderas del mundo y en cuyo diagnóstico y comportamiento epidemiológico no tenemos experiencia en nuestro medio.

Los métodos de cultivo y aislamiento de probada eficacia para otros serovares, según la experiencia de los autores, probablemente no sean óptimos para cepas pertenecientes al serogrupo Sejroe. La cepa aislada se mostró particularmente fastidiosa en su desarrollo y, si bien la bibliografía así lo acredita, también recomienda la utilización de medios

adaptados específicamente a los requerimientos de cepas bovinas de este serogrupo (8-12).

El hámster, que constituye una herramienta muy valiosa para el aislamiento de cepas de otros serovares, no resultó efectivo en este caso.

*Hardjo bovis* se ha transformado en los últimos años en el foco de los especialistas en leptospirosis bovina en todas partes del mundo.

Ha producido una revolución en el campo del diagnóstico, la epidemiología, la taxonomía y la producción y control de vacunas (14-15-16-17).

*Hardjobovis* ha sido aislada en Chile y es un tema instalado en Paraguay y Uruguay.

Confirmar su presencia en el País, definir claramente su impacto epidemiológico efectuando aislamientos en diferentes zonas y tipos de explotaciones, mejorar la metodología diagnóstica y estudiar el comportamiento inmunogénico, constituirán los desafíos a afrontar en los próximos años.

### **Bibliografía:**

1. KOVAL, A., LÓPEZ, S., NARDELLO, M., VENA, M.M., MARGUERITTE, J. 2007. Aislamiento, tipificación y evaluación de la capacidad inmunogénica y de protección cruzada de una cepa de *Leptospira interrogans* perteneciente al serogrupo Pomona. Vet. Arg. Vol XXIV. Nº 235.
2. LICOFF, N., KOVAL, A., LÓPEZ, S., MARGUERITTE, J., MEJÍA, M. 2008. Brote de Leptospirosis en feed lot: descripción del caso, confirmación diagnóstica y medidas de control implementadas. Vet. Arg. Vol. XXV. Nº 250.
3. ARGENTO, E., CAMINO A. R., DRAGUI G., DORTA DE MAZZONELLI G., MAZZONELLI J., SEIJO A., STIEBEL C. 2002.- Vacunas y Vacunaciones en Leptospirosis. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina. Memorias II Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades emergentes. Buenos Aires.
4. MYERS, D.M., JELAMBI, F. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina. 1975. Trop. Geogr. Med. 27: 63-70.
5. MYERS, D. M. 1976. Serological studies and isolations of serotype *hardjo* and *Leptospira biflexa* strains from horses of Argentina. J. Clin. Microbiol. 3: 548-555.

6. MARSHALL, R. B., BROUGHTON, E. S., HELLSTROM, J. S. 1979. Protection of cattle against natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. N. Z. Vet. J. 27: 114-116.
7. ELLIS, W.A., O' BRIEN, J.J., CASSELLS, S.D., NEILL, S.D., HANNA, J. 1985. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* following calving or abortion. Research in Veterinary Science. 39: 296-298.
8. ELLIS, W.A., MONTGOMERY, J., CASSELLS, J. A. 1985. Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Research in Veterinary Science. 39: 292-295.
9. THIERMANN, A. B., HANDSAKER, A. 1985. Experimental infection of calves with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*: conjunctival versus intravenous route of exposure. Am. J.Vet.Res. 46: 329-331.
10. KINGSCOTE, B., PROULX, J. 1986. The successful management of *Leptospira hardjo* infection in a beef herd in Northern Ontario. 1986. Can. Vet. J. 435-439.
11. LE FEUBVRE, R. B., THIERMANN, A. B. 1986. DNA homology studies of leptospires of serogroups Sejroe and Pomona from cattle and swine. Am. J.Vet.Res. 47: 959-963.
12. BOLIN, C. A., ZUERNER, R. L., TRUEBA, G. 1989. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* in bovine urine. Am. J.Vet.Res. 50: 1001- 1003.
13. NERVING R., GARRETT L. 1979.- Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. Am. J.Vet.Res.,40(8): 1197-1200.
14. BOLIN, C. A., THIERMANN, A. B., HANDSAKER, A., FOLEY, J. W. 1989. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *harjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle. Am. J.Vet.Res., 50 (1): 161-165.
15. BOLIN, C. A., ZUERNER, R. L., TRUEBA, G. 1989. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *harjo-bovis* on type *hardjo-bovis* infection in cattle. Am. J.Vet.Res., 50 (12): 2004-2008.
16. BOLIN, C. A., ALT, D. P. 2001. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. Am. J.Vet.Res., 62(7): 995-1000.

17. NAIMAN, B. M., ALT, D. P., BOLIN, C. A., ZUERNER, R. L., BALDWIN, C. L. 2001. Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th 1 Immunity Comprising Responses by CD4 and gd T Lymphocytes. *Infection and Immunity*, 69 (12): 7550-7558.

---