

Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN Nº 023/2021

GENERAL PICO, 25 de Febrero de 2021.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: "*Presencia de leptospirosis en ecosistemas acuáticos y aguas residuales urbanas de la región noreste de la provincia de La Pampa*" y,

CONSIDERANDO:

Que el citado proyecto estará bajo la dirección de la MSc. Claudia Andrea TORTONE y la co-dirección de la MSc. Delia Susana ORIANI, participando en carácter de Asesora la Dra. Paula Lorena MARTIN, en carácter de Investigadores: la M.V. Ana Sandra STASKEVICH, la M.V. Yesica Paola MILLAHUEQUE, la Dra. Ana Inés PORTU, el M.V. Franco LUCERO ARTEAGA, en carácter de Personal de Apoyo la No Docente Lorena FERNANDEZ y en carácter de Asistentes de Investigación los/as estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria: Vanesa Carolina NORIEGA y Ángel Gabriel TORRES, todos/as pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, a excepción de la Dra. Paula Lorena MARTIN perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata.

Que tendrá una duración de cuarenta y ocho (48) meses, a partir del 01 de Enero de 2021 y hasta el 31 de Diciembre de 2024.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Aplicada.

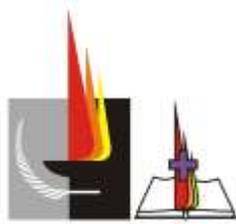
Que ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5º Anexo I de la Resolución Nº 100/99 y su modificatoria Nº 88/02 del Consejo Superior, estipula que: "*Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca*".

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución Nº 100/99 y Nº 88/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. Norma Bibiana VANASCO (UNL) y la Dra. Bibiana BRIHUEGA (INTA CONICET)

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 25 de Febrero de 2021, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, es aprobado por unanimidad.



Corresponde a Resolución Nº 023/2021

//2.-

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *"Presencia de leptospirosis en ecosistemas acuáticos y aguas residuales urbanas de la región noreste de la provincia de La Pampa"*, bajo la dirección de la MSc. Claudia Andrea TORTONE y la co-dirección de la MSc. Delia Susana ORIANI, participando en carácter de Investigadores: la M.V. Ana Sandra STASKEVICH, la Dra. Paula Lorena MARTIN, la M.V. Yesica Paola MILLAHUEQUE, la Dra. Ana Inés PORTU, el M.V. Franco LUCERO ARTEAGA, en carácter de personal de apoyo la No Docente Lorena FERNANDEZ y en carácter de Asistentes de Investigación los/as estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria: Vanesa Carolina NORIEGA y Ángel Gabriel TORRES, todos/as pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, a excepción de la Dra. Paula Lorena MARTIN perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata, el cual tiene doce (12) folios y que se adjunta como Anexo I de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración de cuarenta y ocho (48) meses, a partir del 01 de Enero de 2021 y hasta el 31 de Diciembre de 2024

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTICULO 4º: Regístrese, comuníquese, tomen conocimiento los/as interesados/as. Pase a Secretaría de Investigación, Posgrado y Extensión. Cumplido, archívese.

Presidente
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam



TITULO: PRESENCIA DE LEPTOSPIRAS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y AGUAS RESIDUALES URBANAS DE LA REGIÓN NORESTE DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA

INTEGRANTES

TORTONE, Claudia Andrea

Firma digital

ORIANI, Delia Susana

Firma digital

STASKEVICH, Ana Sandra

Firma digital

MARTIN, Paula Lorena

Firma digital

MILLAHUEQUE, Yesica Paola

Firma digital

PORTU, Ana Inés

Firma digital

LUCERO ARTEAGA, Franco

Firma digital

FERNANDEZ, Lorena

Firma digital

NORIEGA, Vanesa

Firma digital

TORRES, Angel

Firma digital



Número de Proyecto:

Año:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: “Presencia de leptospiras en ecosistemas acuáticos y aguas residuales urbanas de la región noreste de la provincia de La Pampa”

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.5 ÁREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuaria y del Ambiente

1.6 SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Veterinarias

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo Hs x semana
Tortone Claudia Andrea	27-22569227/6	MSc.	IV	D	Bacteriología y Micología FCV	Prof. Adj. SE	10
Oriani Delia Susana	27-13737916/9	MSc.	II	CD	Bacteriología y Micología FCV	Prof. Titular E	10
Stasckevich Ana Sandra	27-16520129/4	MV	IV	I	Bacteriología y Micología FCV	JTP E	10
Martin Paula Lorena		Dr.	IV	A	UNLP	JTP E	2
Millahueque Yésica Paola	27-33039192/3	M.V.		I	Bacteriología y Micología FCV	Ay.1° S	3
Portu Ana Inés	27-31892745/1	Dra.		I	Bacteriología y Micología FCV	JTP S	3
Lucero Arteaga Franco Exequiel	20-36221849/8	M.V.		I	Virología e Inmunología Basica FCV	Ay.1° SE	2

Fernández Lorena	27-21552702/1	Técnica		Pers Apoyo	No docente FCV UNLPam	Categ.7	3
Noriega Vanesa Carolina	27-35137437/9	Estudiante		AI	Medicina Veterinaria		3
Torres Ángel Gabriel	20-34115444/9	Estudiante		AI	Medicina Veterinaria		3

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1 . INTEGRANTES

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac . Hs./Sem

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Fernández, Lorena	Laboratorio	3

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesista		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: 4 años

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2021

FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2024

4. RESUMEN del PROYECTO:

La leptospirosis es considerada una zoonosis reemergente debido al aumento de su incidencia y múltiples brotes a nivel mundial. En nuestro país han demostrado que el contacto prolongado con las inundaciones fue el riesgo individual más importante y nuestra región es un área climática propensa a ellas por precipitaciones abundantes. La asociación entre el contacto con el agua ambiental y el riesgo de infección por *Leptospira* 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 la prevalencia de la enfermedad y subestimación del riesgo real relacionado con la propagación de infecciones causadas por *Leptospira*. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de leptospirosis en aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa mediante el cultivo en medios adecuados y posterior identificación de especies y diferenciación de leptospirosis patógenas mediante técnicas de PCR y

qPCR. También se pretende identificar serovares predominantes. Se espera aislar leptospiras en ambientes acuáticos de zonas rurales y/o urbanas, pues se han descritos casos de leptospirosis en la provincia y en poblaciones lindantes relacionados a los periodos de abundantes lluvias.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)

Leptospira /agua ambiental/ PCR tiempo real/clima templado

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res.N° 097-CS-12.

Leptospirosis is considered a reemerging zoonosis due to its increased incidence and multiple outbreaks worldwide. In our country they have shown that prolonged contact with floods was the most important individual risk and our region is a climatic area prone to them due to abundant rainfall.

The association between contact with ambient water and the risk of *Leptospira* infection in temperate climates is not entirely clear. Diagnostic problems and the lack of systematic and adequate monitoring of leptospirosis can result in incomplete knowledge about the prevalence of the disease and an underestimation of the real risk related to the spread of infections caused by *Leptospira*. The aim of this work is to determine the presence of leptospirae in environmental waters of the northeast region of La Pampa province, through culture in suitable media and subsequent species identification and pathogenic leptospirae differentiation using PCR and qPCR techniques. It is also intended to identify predominant serovars. It is expected to isolate leptospirae in aquatic environments of rural and / or urban areas, since cases of leptospirosis have been described in the province and in neighboring populations related to periods of abundant rainfall.

4.3. Key words: (de 4 a 6)

Leptospira/environmental water/ real time PCR/mild weather

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La leptospirosis es una enfermedad considerada como la zoonosis de mayor distribución en el mundo producida por espiroquetas del género *Leptospira*, la cual se adquiere a través del contacto directo e indirecto con orina de animales infectados (Stanchi, 2007). Hay un amplio espectro de enfermedad humana asociada a leptospirosis que va desde infecciones subclínicas a una insuficiencia multiorgánica severa asociada con alta mortalidad (Farr, 1995; Bharti *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2005). En los animales domésticos produce grandes pérdidas económicas por agalactia, abortos y muerte perinatal. La vía de entrada del microorganismo es a través de heridas en la piel o mucosas de la boca, nariz, ojos u oídos, pudiendo incluso penetrar a través de la piel íntegra macerada (Stanchi, 2007).

El género *Leptospira* se puede clasificar fenotípicamente en dos especies *L. interrogans sensu lato* (cepas patógenas) y *L. biflexa* (cepas no patógenas). Cada especie se agrupa a su vez en serogrupos y el taxón básico de la clasificación es el serovar (Kmety y Dikken, 1993). Se han descrito más de 60 serovares de *L. biflexa* y más de 200 serovares, organizados en 24 serogrupos, dentro de *L. interrogans sensu lato* (Kmety y Dikken, 1993). Por otro lado, según la clasificación genotípica, en base a estudios de hibridación, se incluyen dentro del género *Leptospira*, un total de 20 especies. Aparentemente hasta ahora, de esas 20 especies, 7 serían patógenas, 6 de patogenicidad intermedia o desconocida y 7 no patógenas. Hay muy poca correlación entre esta nueva clasificación genómica y la anterior. Según esta última, serovares patógenos y no patógenos se encuentran dentro de una misma especie y un serovar, puede pertenecer a más de una especie (Cerqueira y Picardeau, 2009). Además, un serogrupo puede ser ubicado en varias especies diferentes. Por lo tanto, ni el serogrupo, ni el serovar predicen la especie de *Leptospira* (Levett, 2001). También es importante considerar que la virulencia depende de la cepa infectante; cepas de un mismo serogrupo o serovar pueden comportarse con diferentes patrones de virulencia. Y es de relevancia para el diagnóstico indirecto, que la inmunidad contra leptospira es serogrupo-específico (Vanasco *et al.*, 2016).

Las leptospiras patógenas tienen los roedores como sus reservorios más relevantes, aunque también lo son las comadrejas, coypus, zorros, armadillos, cuises y animales ectotermos. Por otro lado, por su contacto con el hombre, porcinos, bovinos, equinos y caninos pueden generar brotes de leptospirosis (Stanchi, 2007). La condición de reservorio de dichos animales se debe a la relación simbiótica entre la leptospira y su

hospedador. Existe un equilibrio biológico entre algunas cepas de leptospiras y ciertas especies animales en las cuales persisten en los túbulos contorneados renales, sin producir efecto patógeno en su epitelio. Aunque este equilibrio se instala sólo en ciertos casos, mientras que en otros se pierde o es mucho más difícil de establecer, padeciendo el animal una forma severa de enfermedad e incluso la muerte (Stanchi, 2007).

La incidencia de la enfermedad es mayor en climas cálidos y húmedos (Farr, 1995; Levett, 2001) y es frecuente la ocurrencia de brotes estacionales de leptospirosis después de inundaciones, como se describen en el Centro y Sur de América (Levett, 2001; Vanasco *et al.*, 2000, 2002, 2004; AAVLD, 2017).

La asociación entre el contacto con el agua ambiental y el riesgo de infección por *Leptospira* en climas templados no está totalmente claro. Se han descrito como fuentes de exposición ambiental implicadas en casos de leptospirosis humana en regiones templadas, el agua de grifo, pozos y pozos estancados, aguas residuales y aguas recreativas (Muñoz Zanzi *et al.*, 2014). En las poblaciones rurales en particular, la leptospirosis humana se ha atribuido históricamente al contacto directo con la orina del ganado infectado a través del cuidado de los animales (Hartskeerl *et al.*, 2011). Sin embargo, es también manifiesta la leptospirosis adquirida a partir del agua ambiental (Muñoz Zanzi *et al.*, 2014). En Argentina, durante los años 1999-2005, aunque las actividades asociadas con las ocupaciones rurales fueron factores de riesgo significativos, el contacto prolongado con las inundaciones fue el riesgo individual más importante de leptospirosis (Vanasco *et al.*, 2008). A nivel urbano, otros son los factores que intervienen en esta infección como las condiciones de vida de la población: urbanización desordenada, viviendas precarias, falta de saneamiento ambiental, que se agravan frente a los cambios climáticos por abundantes precipitaciones e inundaciones (Vanasco *et al.*, 2016).

Es importante tener en claro el concepto de que la epidemiología de la leptospirosis es compleja y dinámica, van surgiendo nuevos grupos de riesgo a medida que se modifica el hábitat, las prácticas rurales y los reservorios (Vanasco *et al.*, 2016). Recientemente en nuestro país se han agregado dos nuevas especies de roedores como huéspedes de leptospiras patógenas, no antes descritas como reservorios; y se detectaron roedores positivos a *Leptospira* spp. en sitios inundables y no inundables, verificando que las infecciones con este patógeno no son exclusivas de las tierras inundables (Colombo *et al.*, 2018).

Nuestra región, que forma parte del este de la provincia de La Pampa, es un área climática propensa a sufrir inundaciones por precipitaciones abundantes, aunque el desvío porcentual de precipitaciones varía año a año. En el 2017, según datos del Servicio Meteorológico Nacional, se alcanzaron registros de precipitaciones superiores a los 800 mm. El este de La Pampa, noroeste y centro-este de Buenos Aires fue afectado por torrenciales lluvias que produjeron anegamientos e inundaciones que se agravaron con un fin de invierno extremadamente lluvioso. La Pampa fue una de las áreas con excesos más significativos en el desvío porcentual de precipitaciones junto con todo el este y sur de Patagonia, Buenos Aires y el Litoral (Servicio Meteorológico nacional, 2017).

La leptospirosis humana en Argentina se ha reportado en todas las provincias. Según el Boletín del Sistema de Vigilancia de Salud de la Nación los casos acumulados de leptospirosis en La Pampa durante el 2016 fueron 12 casos notificados de los cuales 3 fueron confirmados, y hasta la 46ª semana epidemiológica del 2017 se notificaron 13 casos sin ninguna confirmación. No es un dato menor que en enero del 2017 fueron confirmados dos casos, uno fatal, en la localidad cordobesa de Huinca Renancó que limita al norte con la Provincia de La Pampa y a sólo 28 km de Realicó, última ciudad lindante (<http://www.villamariaya.com/se-detectaron-dos-casos-foraneos-uno-fatal-de-leptospirosis-en-laboratorios-gornitz/>). En La Pampa se notificaron 4 y 5 casos en los años 2018 y 2019 respectivamente.

Por otro lado, los primeros registros de la presencia de leptospiras en armadillos en La Pampa fueron descritos por Kin *et al.* (2015). Se examinó la presencia de anticuerpos contra 21 serovares de *Leptospira* en *Chaetopractus villosus*, capturados entre 2007 y 2010, mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT) donde resultaron positivas 35/150 (23,3%) muestras de suero. En 14 animales se encontraron lesiones compatibles, las que resultaron más graves en animales con títulos serológicos elevados (3200) y en 3 animales estudiados se detectó el agente causal.

También se cuenta con un reporte sobre leptospirosis subclínica en caninos alojados en la canilera municipal de General Pico. (Mengelle *et al.*, 2013), Al momento del muestreo (diciembre de 2011) se encontraban 252 caninos. De todas las muestras analizadas, el 61,5% (155 caninos) arrojaron resultados positivos a leptospiras, con títulos de 1/100 o superiores.

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 (Licoff *et al.*, 2008; Koziol *et al.*, 2016; Koval *et al.*, 2017). En un estudio de

sueros bovinos analizados de establecimientos de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba y Entre Ríos, el 39,5% presentaron títulos, al menos, a un serovar de *Leptospira* spp. Los más comunes fueron los serovares Hardjo; Wolffi, Grippytyphosa, Pomona, Copenhageni, Canicola, Tarasovi, Castellonis y Pyrogenes (Garro *et al.*, 2011).

Para realizar un estudio ambiental sobre la presencia de leptospirosis se debe tener en cuenta los factores fisicoquímicos que determinan su supervivencia en el medioambiente: temperatura templada (25 °C), ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica. (AAVLD, 2017) Las leptospirosis pueden sobrevivir en suelos cálidos y húmedos y en agua durante semanas o meses (Levett, 2001). Por tanto, las áreas con lagunas, riachuelos y bebederos en general, que congregan a un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis. Estos factores van a propiciar la existencia de una cierta estacionalidad en la presentación de la enfermedad, en relación principalmente con la época de lluvias (AAVLD, 2017).

En Argentina se han obtenido aislamientos de fuentes de agua (ríos, lagos y arroyos) en Buenos Aires, Santa Fe, Corrientes y la provincia de Jujuy (Brihuela *et al.* 2006; Francois Barbagelata *et al.*, 2013; Scialfa *et al.*, 2018).

La evaluación de la presencia de *Leptospira* en el medio ambiente se ha facilitado en gran medida por el avance de los métodos moleculares. El refinamiento y la expansión continuos de los métodos de PCR han permitido una amplificación más específica y rápida de leptospirosis patógena en una variedad de muestras ambientales, lo que hace posible identificar sitios de agua y suelo contaminados (Muñoz Zanzi *et al.*, 2014).

Varios estudios han utilizado estas herramientas moleculares para la detección de *Leptospira* patógenas en muestras ambientales de agua con el propósito de documentar fuentes de riesgo potencial de exposición humana (Muñoz Zanzi *et al.*, 2014). El gen *lipL32* de *Leptospira* spp. codifica una lipoproteína de membrana externa que, a diferencia de *lipL21*, se considera un factor de virulencia que no está presente en especies no patógenas (Haake *et al.*, 2000; Nally *et al.*, 2007; Picardeau *et al.*, 2008). Es altamente inmunogénica y es expresada en altos niveles tanto en cultivos como en la infección natural en mamíferos (Haake *et al.*, 2000).

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Martin PL, Sanchi NO, Brihuela BF, Bonzo E, Galli L, Arauz M. Diagnóstico de leptospirosis canina mediante técnicas moleculares: evaluación de dos ensayos de PCR en comparación con el microaglutinación. Pesquisa Veterinária Brasileira. Accepted manuscript ID PVB-5868 (18-Dec-2018)

Martin PL, Arauz MS, Stanchi NO. Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria Analecta Vet 2015; 3 (1): 26-38

Martin LP. Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. 2018. Tesis doctoral. UNLP.

Martin PL, Arauz MS, Linzitto O, Stanchi NO. Diagnóstico de leptospirosis canina. Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Bs. As. La Plata: Colegio de la provincia de Buenos Aires 2015. Vol. 19 N° 61. P38-43. ISSN 2250-5040.

Martin PL, La Malfa J, Giboin G, Puidellibol M, Arauz MS, Linzitto O, Del Curto B, Gomez F, Stanchi NO. Prevalencia de Leptospirosis en caprinos de la provincia de San Juan, Argentina. Veterinaria cuyana (en línea). San Luis: Universidad Católica de Cuyo. 2012 vol 7 y 8. P25-27. ISSN 1850-356X.

Stanchi NO, La Malfa J, Giboin G, Brihuela B, Grune S, Romero G, **Martin PL**, Arauz MS, Linzitto O, Del Curto B, Frigerio O, Fiochitti L. Leptospirosis en animales de granja en la provincia de San Luis, Argentina. Veterinaria Cuyana (en línea). San Luis: Universidad Católica de Cuyo. 2012 vol 7 y 8. P10-13. ISSN 1850-356X.

Libros

Linzitto O, Stanchi NO, Brihuela B, Passaro D, Soncini A, Gatti, M, Tunes M L, Del Curto B, **Martin PL**, Orellana J. leptospirosis y leptospirosis en Argentina. La Plata: Edición el autor. 2014. Pag 57. ISBN:978-987-33-5783-1.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Tortone CA, Zumárraga JM, Gioffré AK, Oriani, DS. "Utilization of molecular and conventional methods for the identification of nontuberculous mycobacteria isolated from different water sources". Int J Mycobacteriol 2018;7:53-60. http://www.ijmyco.org/temp/IntJMycoBacteriol7153-6147574_170435.pdf
Claudia A. Tortone, Delia S. Oriani, Ana S. Staskevich, Alejandra S. Oriani, Lilia M. Gino, María J. Marfil; Alejandro Nava Vargas, Andrea K. Gioffré, Martín J. Zumárraga. "Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas en ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina". Rev Argent Microbiol. 2019; 51(3):259-267.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

PROBLEMA CIENTÍFICO.

La leptospirosis es considerada una zoonosis reemergente debido al aumento de su incidencia y múltiples brotes a nivel mundial, con un desconocido, pero probable alto impacto en salud pública y veterinaria.

Si bien las actividades asociadas con las ocupaciones rurales siguen siendo factores de riesgo significativos, en nuestro país han demostrado que el contacto prolongado con las inundaciones fue el riesgo individual más importante de leptospirosis. Se han descrito numerosos casos aislados y brotes, tanto rurales como urbanos, durante los períodos estacionales de abundantes lluvias e inundaciones. Pero la información sobre la real incidencia de casos de leptospirosis en nuestro país es aún limitada. Tampoco está claro como es el riesgo de infección de este patógeno en los climas templados. Además, la naturaleza de la enfermedad relacionada con muchos signos inespecíficos puede causar dificultades significativas para hacer un diagnóstico preciso. Los problemas de diagnóstico y la falta de un monitoreo sistemático y adecuado de la leptospirosis en muchos países pueden dar como resultado un conocimiento incompleto sobre la prevalencia de la enfermedad y puede causar una subestimación del riesgo real relacionado con la propagación de infecciones causadas por *Leptospira* spp.

Nuestra región es un área climática propensa a sufrir inundaciones por precipitaciones abundantes. Si bien hay algunos estudios realizados en animales reservorios, no se conoce la posible persistencia de esta espiroqueta en el medio ambiente y su riesgo potencial.

HIPOTESIS

Las aguas superficiales ambientales de la región noreste de la provincia de La pampa constituyen un riesgo potencial temporal para la propagación de infecciones causadas por leptospirosis.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de *Leptospira* spp patógenas en las aguas ambientales de la región noreste de la provincia de La Pampa

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Recuperar *Leptospira* spp a partir de muestras de agua ambientales ya sea agua de lluvia estancada, agua de canales, de humedales, etc.

-Diferenciar los aislamientos de leptospirosis patógenas de las no patógenas mediante la técnica de PCR en tiempo real.

-Identificar los serovares de las leptospirosis patógenas aisladas.

RESULTADOS ESPERADOS

Aunque el aislamiento requiere procedimientos meticulosos y lentos, se espera aislar leptospirosis patógenas tanto en ambientes acuáticos de zonas rurales como en las zonas urbanas, pues se han descritos casos de leptospirosis en la provincia y poblaciones lindantes relacionados a los periodos de abundantes lluvias.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Muestreo:

Se tomarán muestras de aguas ambientales, ya sea proveniente de humedales, canales, agua de lluvia estancada, etc. en los departamentos de Maracó, Trenel, Realicó y Chapaleufú de la provincia de La Pampa, y en zonas de influencia. Se tendrán en cuenta las consideraciones descriptas por Bejo *et al.* (2017). La toma de muestras se realizará al azar y el número de las mismas dependerá de la distribución temporal de las

precipitaciones y lugares de anegamiento o estancamiento de las aguas, ya que se intercalan temporadas de abundantes lluvias con otras de sequía. Se monitorearán a campo el pH y la temperatura. Se tomarán muestras preferentemente a primeras horas del día y en aquellas aguas de pH igual o superior a 7,5 (Francois Barbagelata *et al.*, 2013) donde es más probable su aislamiento. Se utilizarán muestreadores estériles; la toma de muestra se realizará si es posible aproximadamente entre 15 a 30 cm por debajo de la superficie del agua; se tendrá en cuenta áreas sujetas a la presencia de animales y/o sombreadas.

Se determinará con GPS las coordenadas de localización de los sitios muestreados. En los humedales se tomarán volúmenes de 500 mL en recipientes estériles, de al menos 4 sitios, y se tomarán 100 mL de las aguas de drenajes, estancadas, de canales, etc. Las muestras se transportarán al laboratorio refrigeradas y se procesarán dentro de las 12 h.

Filtración y siembra:

Las muestras de agua se filtrarán a través de una membrana estéril. En caso de muestras de aguas de alta turbidez, se aplicará una prefiltración utilizando papel de filtro Whatman, antes de la filtración a través de un filtro de membrana de poros de 0,22 µm. Una muestra del agua filtrada (1 mL) se inoculará en medio líquido Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (medio EMJH) y medio Fletcher para aislamiento de leptospiros, preparados en nuestro laboratorio (Martín, 2018), adicionados con 5-fluorouracilo (5-FU, 200 µg/mL), 0,1 mL por 5 mL de medio (Francois Barbagelata *et al.* 2013). Posteriormente, los tubos sembrados se incubarán por duplicado en estufa a 28-30 °C durante un tiempo máximo de 180 días, observándolos semanalmente mediante microscopía de campo oscuro.

Extracción de DNA:

A partir de cada cultivo positivo a *Leptospira* spp. se utilizará un método de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) o similar, según las indicaciones del fabricante y de acuerdo a Martín (2018). Mediante un espectrofotómetro DeNovix DS-11 se determinará la pureza y concentración en ng/µL mediante la razón 260/280 nm. El DNA de cada cepa se conservará a -20 °C hasta su procesamiento.

PCR convencional:

En primer lugar, se realizará un ensayo de PCR convencional específico de género para detectar *Leptospira* spp., dirigido al gen *rrs*. Se utilizará un protocolo publicado previamente por Mérien *et al.* (1992), con modificaciones menores. La mezcla de reacción se preparará en un volumen de 25 µL, con 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, MgCl₂ 2 mM, 1 µM de cada cebador (A y B), 1U Taq DNA Polymerase (Productos Bio-Lógicos, Argentina) y 5 µL de ADN molde. Se utilizará agua ultrapura y ADN de *L. interrogans* serovar Canicola como controles negativos y positivos, respectivamente. El ensayo de PCR convencional *rrs* se realizará en un termociclador Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler PCR (Bio-Rad, CA, EE. UU.) Los productos amplificados se someterán a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en buffer Tris-Borato-EDTA 1 × (Tris 89 mM, 89 mM de ácido bórico, EDTA 2 mM, pH 8,3) con 1 µg / mL de bromuro de etidio durante 60 minutos a 90V. Las bandas se visualizarán bajo luz ultravioleta (296 nm) y se grabarán utilizando un software de adquisición y análisis de imágenes Doc-It LS (UVP, Upland, CA, EE. UU.). Los productos amplificados serán secuenciados en ambos sentidos usando cebadores descritos por Zaranonelli *et al.* (2018).

Técnica lipL32- qPCR

Posteriormente, en las muestras positivas con ese primer ensayo se realizará un ensayo de PCR en tiempo real *lipL32* para detectar específicamente leptospiros patógenos de acuerdo con el método descrito por Villumsen *et al.* (2012), con algunas modificaciones (Martín, 2018). Los cebadores amplificarán 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'-AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTCACTACCT-3' y *lipL32* reverse: 5'-TGGGAAAAGCAGACCAACAGA-3'). Para identificar el amplicón se utilizará 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 amplificación se utilizará un equipo de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, EE. UU.). Agua ultrapura y el ADN de *L. interrogans* serovar Canicola se utilizarán como controles negativos y positivos, respectivamente. Además, se incluirá un control de extracción de ADN negativo.

Identificación fenotípica (serotipificación) con la técnica de MAT.

La identificación serológica de las leptospiros patógenos será realizada con el test de microaglutinación (MAT) descrita por WHO, 2003. (OIE, 2008)

Metodos estadísticos.

Las distribuciones de las muestras positivas de *Leptospira* se describirán por tipo de muestra de agua (humedales, canales, aguas estancadas de lluvia, etc) y zona (rural o urbana), utilizando frecuencias y pruebas de chi-cuadrado o pruebas exactas de Fisher según corresponda.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

El aumento del régimen de lluvia en La Pampa a lo largo del tiempo, ha derivado en cambios en el ecosistema, llevando a la conversión de extensas aéreas semidesérticas o de monte ralo a suelos húmedos con pastizales y varias zonas inundadas, acentuando la influencia de un factor importante en la transmisión de esta enfermedad.

Por otro lado, se cree que la incidencia notificada de leptospirosis es más alta en las regiones que tienen acceso a los laboratorios de Centros de referencia para su diagnóstico, entre ellos la confirmación serológica con la prueba de aglutinación microscópica. Es así que, las tasas de incidencia más altas de leptospirosis en Argentina son encontradas en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe.

Llevar a cabo este proyecto significaría la posibilidad de determinar la presencia de leptospiras en las fuentes de agua ambientales de diferentes orígenes en nuestra zona y el riesgo que ello implica y, en segundo lugar, se afianzaría la posibilidad de establecer un centro de diagnóstico de leptospirosis en La Pampa, en nuestra facultad.

La leptospirosis es “una enfermedad a prevenir no a curar” (AAVLD, 2017) y es un buen ejemplo para el marco de una visión integrada entre la salud pública, la salud animal y el medio ambiente, “el camino para prevenir, detectar, responder y controlar enfermedades comunes al hombre y los animales” ([FAO-OIE-WHO, 2008](#); [FAO-OIE-WHO, 2004](#)).

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	2021		2022		2023		2024
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre
MUESTREO y aislamiento							
Puesta a punto PCR real time							
Identificación patógenas PCR							
Serotipificación MAT							
Tratamiento resultados y publicación							

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

El proyecto se desarrollará en el Laboratorio de Microbiología del CIDEF (Centro de Investigación y desarrollo de Fármacos) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, donde se cuenta con la infraestructura necesaria (espectrofotómetro DeNovix DS-11 y equipo de real time PCR) y además en el laboratorio de Microbiología, que cuenta con microscopio de campo oscuro. La PCR convencional se llevará a cabo en la UNLP.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

En caso de que no se cuente con el financiamiento disponible para la identificación de las Leptospiras patógenas por biología molecular y serotipificación, se requerirá del servicio de la UNLP o INTA Castelar.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

Primer año:

Bienes de Consumo (peptona, extracto de carne, albumina sérica bovina, 5-fluoruracilo, filtros de nitrato de celulosa 0,22µm, Suero de conejo).....	\$ 30.000
(Insumos para biología molecular).....(USD) 250 (\$ 16.125)	
Bibliografía.....	\$.....
Viajes.....	\$12000
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique) micropipeta	USD 207 (\$ 13.352)
Total.....	\$ 71.477

Segundo y tercer año:

Bienes de Consumo (Insumos para biología molecular y o medios de cultivo)USD) 250	
Bibliografía.....	\$.....
Viajes.....	\$.....
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique)	
Total.....	USD 250 (\$16.125)+
TOTAL.....	\$ 87.602

+ valor dólar sin impuesto PAIS.

** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.*

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Adagio L, D' amico G, Wheeler JT, Lattanzi, D, Hagge, M, Hierro J, Somoza J, Toribio, M, Alvarez E. 2000. Estudio preliminar serológico de leptospirosis canina y humana en la ciudad de General Pico y zona de influencia. *Ciencia Veterinaria*.1: 5-11.
- 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>
- [Bejo SK](#), [Amran F](#), [Zakaria Z](#), [Daud A](#), [Sahani M](#), [Evie K](#). 2017. Manual for Laboratory Diagnosis of Leptospirosis: One Health Approach. Universiti Putra Malaysia Press. Malaysia.
- Bharti A R, Nally JE ,Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet. Infect. Dis.* 3:757-71.
- Brihuega B, Auteri C, Romero G, Samartino L. 2006. Aislamiento de una cepa patógena de leptospira de un río urbano: Respuesta frente a quinolonas fluoradas. *Rev Med Vet.* 87(4):144-6.
- Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 9(5):760-768.
- [Colombo VC](#), Gamieta I, GruneLoffler S, [Brihuega B](#), Beldomenico PM. 2018. New host species for *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. [Vet Microbiol.](#) 215:90-2

- Farr RW. 1995. Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 21(1):1-8.
- Francois Barbagelata S, Brihuega Fernández B, Grune Loffler S, Gattarello Marcos V, Correa Pérez D, Petrakovsky Melillo J, Gualtieri Serragatta C, Arestegui De Luca M. 2013. Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. *Rev Cubana Med Trop.* 65(2): 177-184
- Garro C, Romero G, Auteri C, Cisterna C, Sutz G, Grune S, Brihuega B. 2011. Leptospirosis bovina: resultados e interpretaciones de la prueba de aglutinación microscópica. 34° Congreso Argentino de Producción Animal - 1 st Joint Meeting AAPA-ASAS. *Revista Argentina de Producción Animal* 31 (1): 1-47 .
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68, 2276–2285.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* 1:494–501.
- Kin MS, Brihuega B, Fort M, Delgado F, Bedotti D, Casanave EB. 2015. Presence of antibodies against *Leptospira* serovars in *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasyproctidae), La Pampa province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 47(1):41-6.
- Kmety E, Dikken H. 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. *Univ. Press. Groningen.* Netherlands. pp.104.
- Koval A, López S, Lagioia G, Bertino R, Romera MR, Scialfa E. 2017. Brote de leptospirosis en bovinos y humanos en un tambo de Lincoln, Provincia de Buenos Aires. *Vet. Arg.* 34(355). <https://www.veterinariargentina.com/revista/2017/11/brote-de-leptospirosis-en-bovinos-y-humanos-en-un-tambo-de-lincoln-provincia-de-buenos-aires/>
- Kozioł EE, Moliner AI, Vanasco NB, Scala MR, Signorini M, Tarabla H. 2016. Conocimiento de zoonosis en operarios tamberos de la provincia de Santa Fe, Argentina. *In Vet.* 18(1): 45-52.
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 14(2):296-326
- 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.* 25(250):749-755
- 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.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18(5):376-386.
- Mengelle P, Esteben A, Hernández P, Adagio L, Hierro J, Meder A, Miguel C, Rio F, Vaquero P, Wheeler J. 2013. Determinación de brucelosis y leptospirosis en caninos alojados en la canilera municipal de General Pico, La Pampa, Argentina. Libro. Resumen. Jornada. VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional. Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Ingeniería de la UNLPam.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 30(9):2219–24.
- Muñoz-Zanzi C, Mason MR, Encina C, Astroza A, Romero A. 2014. *Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. *Int J Environ Res Public Health* 11:6666–80
- Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA. 2007. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun.* 75:766–73.
- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C, Adler B. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3(2):e1607. doi: 10.1371/journal.pone.0001607.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2017. <https://www.smn.gob.ar/boletines/monitoreo-regional-de-la-precipitaci%C3%B3n-a%C3%B1o-2017-0>
- Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P, Rivero M. 2018 Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 50(3):323-6.
- Stanchi, N. 2007 *Microbiología Veterinaria.* 2º edición. Ed. Inter. Médica. Bs. As. Argentina

- Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enría D. 2000. Descripción de un brote de Leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Rev. Panam. Salud Publica.* 7(1):35-40.
- Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Dalla Fontana L, Manattini S, Prez J, Cerrano D, Sequeira MD. 2002. Brote de Leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe), 1998. *Rev. Arg. Microbiol.* 34(3):124-131
- Vanasco NB, Kemerer R, Oliva ME. 2004. Brote de Leptospirosis rural en un tambo de la provincia de Entre Ríos, Argentina, febrero-marzo 2003. *Salud (i) Ciencia.* 12(4):26-31.
- Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. 2008. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Act Trop.* 107(3): 255-258.
- 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.
- Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. 2012. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods.* 91(1):184-90.
- World Health Organization. 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Malta: World Health Organization and International Leptospirosis Society.
- Zaranonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry, X, Briano C, Ashfield N, Da Silva Silveira C, Dutra F, Easton C, Fraga M, Giannitti F, Hamond C, Macías-Rioseco M, Menéndez C, Mortola A, Picardeau M, Quintero J, Ríos C, Rodríguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto F, Riet-Correa F, Buschiazzo A. 2018. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>.