



Resolución Consejo Directivo FCV N° 489 / 2025 - FCV SCDyRRII

General Pico, 01 de Diciembre de 2025.-

VISTO:

El Expediente N° 840/2025 (registro de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa), caratulado: *“Presentación de un nuevo proyecto de investigación de la MSc. Claudia TORTONE”* y,

CONSIDERANDO:

Que mediante Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 088/2002, ambas del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa, se aprueban las definiciones y pautas para la presentación, acreditación, ejecución y seguimiento de Programas y Proyectos de Investigación.

Que el Proyecto de Investigación: *“Presencia de leptospiras en esmegma prepucial de toros incluidos dentro de los programas de sanidad en el noreste de La Pampa”*, ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que estará bajo la Dirección de la MSc. Claudia TORTONE y la codirección de la Dra. Ana Inés PORTU, participando en carácter de Investigador/as el M.V. Franco Exequiel LUCERO ARTEAGA, la M.V. Marisa Etel GIMENEZ, la M.V. Andrea SCHENHEITER y la M.V. María Lorena MARENGO; en carácter de Asesora la MSc. Delia Susana ORIANI; en carácter de Personal de Apoyo la Nodocente Téc. Lorena FERNANDEZ y en carácter de Asistentes de Investigación el y la estudiante de la carrera Medicina Veterinaria Carlos OCHOA y Solange PIUTRILLAN.

Que tendrá una duración de veinticuatro (24) meses, a partir del 01 de enero de 2026 y hasta el 31 de diciembre de 2027.

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



Que participan en su desarrollo el Departamento de Epizootiología y Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que el 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.

Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. Paula Lorena MARTIN (UNLP) y la Dra. Silvina Edith FRANCOIS (UNR).

Que dicho proyecto cuenta con la aprobación del formulario del protocolo institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación bajo la responsabilidad el consejo asesor institucional para el uso y cuidado de animales de experimentación (CAICUAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 01 de Diciembre de 2025, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, se aprueba por unanimidad.

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

R E S U E L V E:

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 esmegma prepucial de toros incluidos dentro de los programas de sanidad en el noreste de La Pampa”*, bajo la Dirección de la MSc. Claudia TORTONE y la codirección de la Dra. Ana Inés PORTU, participando en carácter de Investigador/as el M.V. Franco Exequiel LUCERO ARTEAGA, la M.V. Marisa Etel GIMENEZ, la M.V. Andrea SCHENHEITER y la M.V. María Lorena MARENGO; en carácter de Asesora la MSc. Delia Susana ORIANI; en carácter de Personal de Apoyo la Nodocente Téc. Lorena FERNANDEZ y en carácter de Asistentes de Investigación el y la estudiante de la carrera Medicina Veterinaria Carlos OCHOA y Solange PIUTRILLAN, el cual contiene catorce (14) folios y consta en el Anexo de la presente Resolución.



FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

2025: 40 años ininterrumpidos de ingreso irrestricto en la UNLPam.
10 años Ley 27204 de Responsabilidad principal e indelegable del Estado Nacional sobre la Educación Superior

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración de veinticuatro (24) meses, a partir del 01 de enero de 2026 y hasta el 31 de diciembre de 2027.

ARTICULO 3º: Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento los/as interesados/as, Secretaría de Investigación y Posgrado, MSc. Claudia TORTONE. Cumplido, archívese.

Esp. Sergio Gentili
a cargo de la Presidencia del Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Pampa



FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

2025

"40 años ininterrumpidos de ingreso irrestricto en la
UNLPam - 10 años Ley 27204 de Responsabilidad
principal e indelegable del Estado Nacional sobre la
Educación Superior"

Corresponde a Resolución N° 489/2025

ANEXO



**TÍTULO: PRESENCIA DE LEPTOSPIRAS EN ESMEGMA
PREPUCIAL DE LOS TOROS INCLUIDOS DENTRO DE LOS
PROGRAMAS DE SANIDAD EN EL NORESTE DE LA PAMPA**

INTEGRANTES

TORTONE, Claudia Andrea

Firma digital

PORTU, Ana Inés

Firma digital

LUCERO ARTEAGA, Franco

Firma digital

GIMENEZ, Marisa Etel

Firma digital

SCHENHEITER, Andrea Belén

Firma digital

MARENGO, Maria Lorena

Firma digital

ORIANI, Delia Susana

Firma digital

OCHOA, Carlos

Firma digital

PIUTRILLAN, Solange

Firma digital

FERNANDEZ, Lorena

Firma digital

Corresponde a Resolución N° 489/2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: Presencia de leptospirosis en esmegma prepucial de toros incluidos dentro de los programas de sanidad en el noreste de La Pampa.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada.

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL:

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES:

1.5 ÁREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuarias y del Ambiente.

1.6 SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencia Veterinaria.

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Departamento de Epizootiología y Salud Pública.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1 INTEGRANTES

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. hs./semana
TORTONE, Claudia Andrea	27-22569227-6	MSc.	IV	D	Bacteriología y Micología	Prof. Adj. exclusiva	20
PORTU, Ana Ines	27-31892745-1	Dra.		CD	Bacteriología y Micología Virología e Inmunología básica	Prof. Adj. SE Ayudante 1° simple	10
LUCERO ARTEAGA, Franco Ezequiel	20-36221849-8	MV		I	Bacteriología y Micología Virología e Inmunología básica	JTP SE.	5h
GIMENEZ, Marisa Etel	27-30284259-6	MV		I	Bacteriología y Micología	Ayd. 1° Simple	2h
SCHENHEITER, Andrea	27-37825039-6	MV		I	Bacteriología y Micología	Ayd. 1° SE	10
MARENGO, M.	27-23468342-5	MV	IV	I	Física	JTP SE	3h

Corresponde a Resolución N° 489/2025

Lorena					Biológica		
ORIANI, Delia Susana	27-13737916-9	MSc.	II	A	Laboratorio Privado		5h
FERNANDEZ Lorena				PA	Nodocente FCV UNLPam		2h
OCHOA, Carlos	20-41185512-1	estudiante		AI	Bacteriología y Micología	Adscripto	2h
PIUTRILLAN Solange	23-40837964-4	estudiante		AI	Bacteriología y Micología	Adscripta	2h

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

2.3.1. BECARIOS:

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

2.3.2. TESISISTAS:

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.
FERNANDEZ, Lorena	Laboratorio	2h

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

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

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: 2 años

3.1. FECHA de INICIO: 01/01/2026

FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/2027

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Leptospira*. En animales puede presentar diferentes manifestaciones clínicas, según la interacción entre el hospedador afectado y la cepa infectante. La leptospirosis bovina por cepas adaptadas al hospedador puede provocar abortos, muerte fetal, partos prematuros y nacimiento de terneros débiles, pero principalmente se asocia con subfertilidad y muerte embrionaria precoz. Esta

Corresponde a Resolución N° 489/2025

enfermedad puede pasar desapercibida comprometiendo la eficiencia reproductiva. El diagnóstico de la leptospirosis genital bovina (LGB) se basa principalmente en la utilización de PCR para la detección del ADN de leptospirosis, el cultivo es difícil y se ha demostrado que la serología no es fiable para la colonización genital y la infección crónica. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de *Leptospira* en esmegmas prepuciales de toros incluidos dentro de los programas de sanidad para otras enfermedades reproductivas, mediante la detección de los genes *lipL32*, *rrs* y *secY*. Se realizará un muestreo estratificado proporcional a partir de toros de establecimientos del noreste de La Pampa. La posibilidad de detectar leptospirosis en los raspajes prepuciales podría ser una herramienta adicional para el control de la LGB, sin necesidad de obtener una nueva muestra en el control de enfermedades venéreas.

4.1 Palabras claves: bovinos, leptospirosis, esmegma prepucial, *LipL32*, *secY*, 16S rARN

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras)

Leptospirosis, a zoonotic disease present worldwide, is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. In animals, it can present different clinical manifestations, depending on the interaction between the affected host and the infecting strain. Bovine leptospirosis caused by host-adapted strains can cause abortions, stillbirths, premature births, and the birth of weak calves, but is more associated with subfertility and early embryonic death. This disease can go unnoticed and undiagnosed, compromising reproductive efficiency. The diagnosis of bovine genital leptospirosis (BGL) is primarily based on the use of PCR for the detection of leptospiral DNA, as culture is difficult and serology has been shown to be unreliable for genital colonization and chronic infection. The objective of this study is to determine the presence of *Leptospira* in the preputial smegma of bulls included in health programs for other reproductive diseases by detecting the *lipL32*, *rrs*, and *secY* genes. To this end, a proportional stratified sampling will be conducted from bulls from farms in northeastern La Pampa. The possibility of detecting leptospira in preputial scrapings could be an additional tool for monitoring BGL, without the need to add a separate sample to monitor venereal diseases.

4.3. Keywords: bovines, leptospirosis, preputial smegma, *LipL32*, *secY*, 16S rARN

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. Introducción

La leptospirosis, una enfermedad zoonótica presente en todo el mundo y es causada por las bacterias patógenas del género *Leptospira*. Las leptospirosis se pueden clasificar según sus características genéticas o fenotípicas. En su clasificación genética, el género *Leptospira* se divide en aproximadamente 68 especies, que se clasifican como patógenas (subclado P1), intermedias (subclado P2) y saprófitas (subclados S1 y S2) (Vicent et al., 2019). En cuanto a la clasificación fenotípica, también conocida como serológica, las cepas de leptospirosis se dividen según las características de los lipopolisacáridos (LPS) de su membrana externa clasificándose en aproximadamente 300 serovares, y los serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos por conveniencia (Levett, 2015). Los serovares patógenos y no patógenos pueden pertenecer a la misma genomoespecie y, dado que se ha demostrado previamente la heterogeneidad genética dentro del mismo serovar, el uso de ambas clasificaciones para la determinación de una cepa está bien establecido (Zhang et al., 2015).

Corresponde a Resolución N° 489/2025

La leptospirosis es una enfermedad de presentación variable, y las manifestaciones clínicas predominantes dependen del serovar implicado, de la edad del estado inmunitario y si la infección es aguda o crónica. Por lo tanto, la leptospirosis animal se caracteriza por infecciones incidentales que resultan en una forma sistémica aguda y grave de la enfermedad, y por infecciones adaptadas, con escaso efecto clínico y mínimo daño patológico en sus hospedadores (Loureiro y Lilenbaun, 2020). Se ha descrito que la leptospirosis bovina se asocia con infecciones por leptospirosis adaptadas al hospedador, como las cepas pertenecientes al serogrupo Sejroe. La leptospirosis bovina por cepas adaptadas puede provocar abortos, muerte fetal, partos prematuros y nacimiento de terneros débiles o de bajo peso, pero se asocia más con subfertilidad y muerte embrionaria precoz. De esta manera, esta enfermedad silenciosa puede pasar desapercibida y sin diagnosticar, comprometiendo la eficiencia reproductiva (Loureiro y Lilenbaun, 2020). Durante muchos años, la infección del tracto genital se ha considerado un efecto secundario de la infección renal, asumiendo que las leptospirosis se encuentran en el tracto genital debido a la bacteriemia causada por la colonización renal. En contraste con esta hipótesis, existe evidencia en la literatura que sugiere que la leptospirosis genital debería considerarse un síndrome específico, disociado de la enfermedad renal/sistémica denominado leptospirosis genital bovina (LGB), que requiere un enfoque único para su diagnóstico y tratamiento (Loureiro y Lilenbaun, 2020; Aymée et al., 2024). La evidencia que sugiere que la leptospirosis genital debe considerarse un síndrome específico es la siguiente: se ha reconocido una respuesta inmunitaria vaginal relevante, generalmente con bajos títulos sistémicos; se ha demostrado experimentalmente la infección por inoculación uterina; se ha planteado la posibilidad de transmisión sexual de leptospirosis en ambas direcciones; y algunas cepas, principalmente del serogrupo Sejroe, colonizan preferentemente el tracto genital y se han asociado más estrechamente con síndromes reproductivos e infección uterina crónica (Loureiro y Lilenbaun, 2020).

El ganado bovino es el hospedador de mantenimiento de las cepas del serogrupo Sejroe, principalmente del serovar Hardjo, que comprende dos variantes serológicamente indistinguibles, pero genéticamente diferentes: Hardjoprajitno, perteneciente a *Leptospira interrogans*, y Hardjobovis, perteneciente a la especie *Leptospira borgpetersenii* (Ellis, 2015; Nally et al., 2018, Borges et al., 2024).

Es bien conocido que, al colonizar los riñones, las leptospirosis se excretan en la orina y pueden contaminar el suelo, las aguas superficiales, los arroyos, los charcos y los ríos. Las infecciones en el ganado bovino se producen por contacto directo con la orina o indirecto con agua contaminada. Este mecanismo de transmisión es esencial para las infecciones incidentales, donde otras especies hospedadoras, como los cerdos y la fauna silvestre, actúan como reservorios de *Leptospira* (Ellis, 2015; Correia et al., 2017). En el caso de las infecciones por cepas adaptadas de *Leptospira*, los toros suelen estar infectados de forma subclínica, por lo que representan una fuente importante de infección para las hembras. La fase crónica de la infección adaptada es aparentemente asintomática y, aunque se produce aborto, la mayoría de las veces la infección se presenta de forma subclínica que con frecuencia es descuidada por los ganaderos, criadores y veterinarios. Fallos reproductivos menos evidentes, como pérdidas embrionarias tempranas y la consiguiente repetición del estro, se han asociado cada vez más con la infección adaptada por leptospirosis en animales (Mori et al., 2017).

La ausencia de síntomas evidentes de la forma asintomática de la leptospirosis reproductiva en el ganado bovino representa un verdadero desafío para el diagnóstico. Además, cuando se detectan síntomas, estos no son claros y, por lo tanto, a menudo se malinterpretan. Dado que la leptospirosis bovina es una enfermedad poco conocida y con un diagnóstico erróneo, ha sido ampliamente descuidada por los investigadores, por lo que existe una necesidad crítica de desarrollar métodos

Corresponde a Resolución N° 489/2025

de diagnóstico clínico (Loureiro y Lilenbaun, 2020). Actualmente, el método estándar de diagnóstico de la leptospirosis se basa en la serología, principalmente la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y métodos directos, como el cultivo bacteriológico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este enfoque es adecuado para detectar la leptospirosis aguda en humanos y animales. En estos casos, los pacientes infectados presentan altos títulos de IgM e IgG, fácilmente detectables mediante MAT, y positivos al cultivo para leptospiras (Loureiro y Lilenbaun, 2020). En contraste, el ganado infectado por cepas adaptadas frecuentemente presenta bajos títulos de anticuerpos (Nally et al., 2018), incluyendo aquellos relacionados con sus propios aislamientos de leptospiras recuperados (Libonati et al., 2017). Por ello, si bien el valor epidemiológico de la MAT reside en su capacidad para predecir el serogrupo circulante, el uso de la serología como método de diagnóstico de la leptospirosis bovina crónica presenta importantes limitaciones (Pinto et al., 2016). Por otro lado, las leptospiras pueden detectarse en la orina del ganado infectado por cepas adaptadas (Nally et al., 2018) pero la excreción es intermitente y poco intensa (Elly, 2015).

Esta descripta la detección por PCR de ADN de leptospiras en fetos abortados y en animales portadores genitales, aunque no presentan anticuerpos detectables mediante la MAT (Libonati et al., 2017)

En este contexto, la detección directa de portadores se hace necesaria para un diagnóstico adecuado a nivel individual. La mayoría de los estudios en esta área enfatizan la detección de portadores renales mediante la detección de ADN por PCR en muestras de orina o riñón. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el estado de los portadores genitales no puede predecirse mediante la detección del agente en la orina. Dado que la asociación entre los resultados de la PCR urinaria y las pérdidas reproductivas es escasa, se requiere un enfoque más específico para el análisis de muestras genitales (Loureiro y Lilenbaun, 2020).

Un estudio realizado por Aymée et al. (2022) demostró que las vacas con fallas reproductivas tuvieron una asociación significativa con muestras genitales positivas a leptospiras por PCR en comparación con la detección de ADN en orina. Ninguno de los animales fue positivo simultáneamente para muestras genitales y orina. Como alternativa, han demostrado que el mucus cervicovaginal es una muestra recomendada, por ser de fácil recolección, no requiere capacitación especializada y el flujo puede ser más representativo del estado del útero. El flujo vaginal se considera un claro reflejo del entorno endometrial y se utiliza ampliamente en el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas reproductivas, como la campilobacteriosis y la tricomoniasis, con resultados fiables (Aymée et al., 2024). Los machos también pueden ser portadores de leptospiras en su tracto reproductivo. Se ha identificado infección genital en toros, semen de carneros, machos cabríos, verracos y camélidos (Aymée et al., 2024).

Algunos investigadores aseguran que la detección mediante técnicas moleculares en muestras genitales es crucial para diagnosticar a los portadores, que deben aislarse y tratarse, sobre todo a aquellos animales recién llegados al rebaño, ya que la introducción de animales infectados, especialmente por cepas de Sejroe, puede comprometer el control del rebaño (Aymée et al., 2024).

Un estudio realizado en nuestro país por Videla et al. (2025), durante un brote de leptospirosis en un rebaño de monta natural, respaldó el uso del esmegma prepucial como muestra fiable para el diagnóstico de leptospirosis en toros y sugieren un posible nuevo sitio de colonización por *Leptospira*, resaltando la importancia de realizar pruebas a machos en rebaños con programas de monta natural para el diagnóstico de la leptospirosis genital bovina.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más específicamente la detección en tiempo real del producto de PCR amplificado (qPCR), es una metodología que puede proporcionar un diagnóstico más oportuno en comparación con el cultivo y la serología. Operativamente es la que

Corresponde a Resolución N° 489/2025

permite procesar mayor cantidad de muestras con la máxima sensibilidad y especificidad. Existe un número limitado de ensayos de PCR en tiempo real para detectar *Leptospira* y no todos estos ensayos son capaces de distinguir entre especies patógenas y no patógenas. Lo más utilizado es un ensayo de qPCR dirigido a *lipL32*, un gen presente únicamente en especies patógenas de *Leptospira* (Stoddard, 2013). Por otro lado, utilizando el método de secuenciación directa del gen *secY*, se ha podido determinar las especies y los genotipos sin necesidad de cultivar el patógeno (Hamond et al., 2016; Pedrosa et al., 2025). La secuenciación parcial del gen 16S ARNr también es recomendada para la determinación de las especies de *Leptospira* aisladas de muestras clínicas (Zarantorelli et al., 2018). En nuestro laboratorio se ha utilizado para la identificación de espiroquetas recuperadas de aguas ambientales (Schenheiter et al., 2023).

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)

Schenheiter, A.; Tortone; C.A.; Portu, A.I.; Staskevich, A.S.; Martin, L.P.; Franco Lucero Arteaga, F. y Oriani, D.S. (2022). Identificación de leptospirosis recuperadas a partir de ecosistemas acuáticos del noreste de La Pampa utilizando una técnica de qPCR para cepas patógenas. *Vetec Revista Académica De Investigación, Docencia Y Extensión De Las Ciencias Veterinarias*, 3(3), 53–55. Recuperado a partir de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/Vetec/article/view/7195>

Schenheiter, A.B.; Portu, A.I.; Giménez, M.E.; Solano, A.; Sánchez, C.; Lucero Arteaga, F.; Marengo, M.L.; Staskevich, AS; Oriani D.S.; Tortone, C.A.; Aislamiento e identificación de espiroquetas compatibles con *Leptospira* spp. a partir de muestras de aguas ambientales en el noreste de la provincia de La Pampa.(2023) Una Salud: Primeras Jornadas interdisciplinarias. UBA. Libro de resúmenes. P133. ISBN: 978-631-00-7192-3

Tortone, C.A.; Portu, A.I.; Schenheiter, A.B.; Lucero Arteaga, F.; Giménez, M.E.; Solano, A.; Sánchez, C.; Marengo, M.L.; Fernández, L.; Martín, P.L. y Oriani D.S. (2024). Presencia de Leptospirosis en ecosistemas acuáticos de la región noreste de la provincia de La Pampa. *Vetec Revista Académica De Investigación, Docencia Y Extensión De Las Ciencias Veterinarias*, 5(3), 89–91. Recuperado a partir de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/Vetec/article/view/8838>

Lucero Arteaga, F.; Mondino, M.; Abrego Alvarez, A.; Heck, V.; Sofia Labégorra, S., Schenheiter, A., Tortone, C.; Gallo Vaulet, M. L.; Bratanich, A., Rodriguez Fermepin, M., Portu A. I. (2024) Presencia de patógenos de interés zoonótico y productivo en animales silvestres de zonas rurales y urbanas del norte de La Pampa. Una Salud: Primeras Jornadas interdisciplinarias. UBA. Libro de resúmenes. P95. ISBN: 978-631-00-7192-3.

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

Detección de genes *esxA* Y *esxB* en micobacterias ambientales capaces de interferir en los ensayos de liberación de interferón- γ para el diagnóstico de la tuberculosis. Tortone CA, Portu AI, Lucero Arteaga FE, Schenheiter AB, Staskevich AS, Sanchez C, Solano A, Gimenez ME, Zumarraga MJ, Eirin ME, Oriani DS. II Congreso de Microbiología Veterinaria: libro de resúmenes / Juliana Cantón ...[et al.]; Compilación de Claudia Inés Cagnoli ... [et al.]. - 1a ed - Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2024. ISBN 978-950-658-615-7

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

Corresponde a Resolución N° 489/2025

Tortone CA, Oriani DS, Staskevich AS, Oriani AS, Gino LM, Marfil MJ; Nava Vargas A, Gioffré AK, Zumárraga MJ. "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 genital bovina representa una infección crónica y silenciosa que provoca subfertilidad y grandes pérdidas económicas para los ganaderos. El efecto de la infección genital por leptospirosis en los machos aún es poco conocido y, en consecuencia, la infección por leptospirosis en toros ha sido muy descuidada.

La LGB se caracteriza por una fisiopatología particular y agentes distintivos, por lo que su control requiere diferentes métodos y estrategias de diagnóstico. Aunque se sabe poco sobre la patogénesis de las cepas de leptospirosis se sugiere que los fallos reproductivos serían un efecto directo de la infección genital y la colonización a largo plazo. Además, se ha sugerido la transmisión sexual, tanto de macho a hembra como en sentido inverso. Se han detectado leptospirosis en ovarios, oviductos, útero, mucus cervicovaginal, semen y esmegma prepucial.

El diagnóstico de la leptospirosis genital bovina se basa principalmente en la utilización de PCR para la detección del ADN de leptospirosis, ya que el cultivo es difícil y se ha demostrado que la serología no es fiable para la colonización genital y la infección crónica. Cabe destacar que las muestras genitales son más positivas a la PCR que las de orina por lo tanto el cribado molecular con muestras genitales es crucial para diagnosticar a los portadores, que deben aislarse y tratarse. Se ha demostrado que la MAT es una técnica limitada para diagnosticar individualmente a los portadores genitales bovinos y que, si sólo se aplica la MAT, los portadores genitales pueden pasar desapercibidos, perjudicando los programas de control.

En acuerdo con otros investigadores se necesitan más estudios que respalden el uso del esmegma prepucial como muestra fiable para el diagnóstico de leptospirosis en toros, resaltando la importancia de realizar pruebas a machos en rebaños con programas de monta natural para el diagnóstico de la leptospirosis genital bovina.

Objetivo general:

Determinar la presencia de *Leptospira* en esmegma prepucial de toros incluidos dentro de los programas de sanidad para otras enfermedades reproductivas, mediante la amplificación de los genes *lipL32*, *rrs* y *secY*.

Objetivos específicos:

- Detectar el genoma de leptospirosis patógenas mediante qPCR dirigida al gen *LipL32* en las extracciones de ADN a partir de muestras de esmegma prepucial de los toros.
- Identificar las genomoespecies de leptospirosis con la secuenciación directa de los genes *rrs* y *secY* amplificados a partir del esmegma prepucial de los toros.

Hipótesis: La prevalencia de la leptospirosis genital bovina se puede estimar detectando ADN de leptospirosis en esmegma prepucial de los toros.

Corresponde a Resolución N° 489/2025

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Muestreo: Para este estudio se evaluarán los toros provenientes de establecimientos ganaderos ubicados en la zona geográfica de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, ubicada en la ciudad de General Pico, al noreste de la provincia de La Pampa, Argentina. Para analizar las muestras de los toros de cada establecimiento se llevará a cabo el muestreo aleatorio estratificado proporcional. El estrato se definirá como el conjunto de toros sometidos a raspaje prepucial de cada establecimiento, cuya variable de estratificación será la ubicación geográfica. Se tomarán muestras aleatorias en cada uno de ellos de acuerdo con el peso en la población de cada estrato hasta completar el número de muestras establecidas. Para establecer el tamaño de la muestra se tendrá en cuenta una prevalencia estimada (p) de 20,33% (Mazzanti et al. 2023), un nivel de confianza del 95% ($Z=1,96$) y una precisión (d) de 0,02 (<https://es.statisticseasily.com/>). El número de elementos de cada estrato se calculará con la siguiente fórmula:

$$n_i = n \cdot \frac{N_i}{N_1 + N_2 + \dots + N_k} = n \cdot \frac{N_i}{N}$$

Donde n es el tamaño muestral total deseado, n_i el número de elementos del estrato i que se incluirá en la muestra, N_i el tamaño del estrato i , y N el número total de elementos de la población.

Toma de muestras: Las muestras utilizadas en este estudio se recolectarán durante los procedimientos sanitarios rutinarios de toros provenientes de establecimientos ganaderos ubicados en la provincia de La Pampa, Argentina, utilizadas durante los programas de sanidad para otras enfermedades reproductivas. Los animales serán inmovilizados en la manga ganadera y muestreados por veterinarios autorizados, siguiendo las normas de bienestar animal exigidas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA, Argentina). Las muestras de esmegma se recolectarán mediante raspadores de plástico descartables, se transportarán en 5 ml de PBS hasta el laboratorio, donde se realizará la extracción de ADN.

Extracción de ADN de las muestras:

La extracción de ADN se realizará utilizando un kit comercial (ADN Puriprep S-kit, Inbio Highway, Bs.As., Argentina) según las indicaciones del fabricante. El DNA se conservará a -20°C hasta su procesamiento. Este procedimiento se llevará a cabo en un laboratorio privado habilitado por SENASA.

Técnica *lipL32*- qPCR

Se realizará un ensayo de PCR en tiempo real *lipL32* para detectar específicamente leptospiras patógenas de acuerdo con el método descrito por Villumsen et al. (2012), con algunas modificaciones (Martin, 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'-AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCT-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/GATCTTTTCGTTGC/3IABkFQ). El protocolo de

Corresponde a Resolución N° 489/2025

amplificación consistirá en 1 ciclo de activación de 3 min a 95 °C seguido de 39 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 13s 60°C, 11s a 72°C).

Caracterización Genética:

Los productos amplificados a partir de los genes *rrs* y *secY* se utilizarán para la genotipificación de las especies de *Leptospiras*.

Detección del gen *rrs* PCR convencional:

Se llevará a cabo un ensayo de PCR convencional específico de género para detectar *Leptospira* spp., dirigido al gen *rrs*, ya puesto a punto en nuestro laboratorio. Se utilizará un protocolo publicado previamente por Mérien et al. (1992), con modificaciones menores, amplificando un fragmento de 331pb del gen 16S rRNA (*rrs*). Se emplearán los oligonucleótidos LeptoA (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') y LeptoB (5'-TTCCCCCATTTGAGCAAGATT-3'). La mezcla de reacción consistirá en 5uL buffer mix (MINT Master Mix 2x, Inbio Highway, Argentina), 0,5uL de Taq, 1,25uL de cada primer, 12 uL de H₂O y 5uL de muestra de ADN microbiano. El protocolo de amplificación consistirá en 1 ciclo de 3 min a 95°C seguidos de 35 ciclos de amplificación (30 s 95C, 30s 55C, 1 min 72C) y un paso final a 72°C 5 min. Los productos de PCR se visualizarán por electroforesis en gel de agarosa 1,5% en TAE 1X.

Detección del gen *secY* PCR convencional:

Se podrá a punto un ensayo de PCR punto final dirigido al gen *secY*, utilizando los oligonucleótidos F-ATGCCGATCATTTTTGCTTC y R-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC amplificando un fragmento de 549 pb de acuerdo a lo descrito en la bibliografía (Ahmed et al. 2006; Bourhy et al. 2013).

Purificación de ADN amplificado y secuenciación:

Los productos de PCR amplificados se purificarán de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando un kit comercial (ADN PuriPrep-GP Kit, Bs.As., Argentina). Se cuantificarán los productos de PCR purificados en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (NanoDrop™ DeNovix DS-11, Thermo Scientific, USA). Se acondicionarán de acuerdo a los requerimientos solicitados por la empresa (Macrogen, Seoul, South Korea) y se enviarán para su secuenciación según Sanger, en ambos sentidos, utilizando los oligonucleótidos LeptoA y LeptoB para el gen *rrs* y los oligonucleótidos R y F para el gen *secY*. Los resultados obtenidos se analizarán con el programa Bioedit y MEGA v1.1. Las secuencias obtenidas serán comparadas con las incluidas en la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análisis estadístico:

La presencia de leptospirosis en una región geográfica está ampliamente influenciada por las características ambientales, sobre todo por el régimen promedio de precipitaciones. Es por ello que el conjunto de toros sometidos a raspaje prepuccial de cada establecimiento se estudiará teniendo en cuenta la ubicación geográfica del mismo, según el departamento de la provincia de la Pampa al cual pertenezca: Realicó, Conhelo, Maracó, Trenel, Chapaleufú, Conhelo y Quemú Quemú. Esta será la variable principal de estratificación del muestreo. Se tomarán muestras aleatorias en cada uno de los estratos con una fijación proporcional. Se determinará la prevalencia en cada estrato (<https://es.statisticseasily.com/>) Los datos se analizarán mediante la prueba Chi-cuadrado de

Corresponde a Resolución N° 489/2025

Pearson para evaluar la independencia entre variables. La prueba Kappa se utilizará para determinar la concordancia entre los métodos utilizados. Todos los análisis estadísticos se realizarán con el software R.

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

La leptospirosis genital bovina es una enfermedad crónica desatendida importante que, a pesar de su forma asintomática e inaparente, provoca subfertilidad y representa un riesgo económico y sanitario considerable para la reproducción del ganado. El conocimiento de su etiología y el uso adecuado de nuevas herramientas para el diagnóstico preciso, principalmente la detección molecular de portadores genitales, son fundamentales para implementar eficazmente los procedimientos de control. La posibilidad de detectar leptospiras en los raspajes prepuciales, una misma muestra ya utilizada para el control de enfermedades venéreas en los bovinos, podría ser una herramienta que se suma al control de LGB sin la necesidad de adicionar otra muestra diferente.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

	2026												2027											
	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Muestreo y extracción de ADN																								
Puesta a punto qPCR gen LipL32																								
Puesta a punto PCR convencional gen secY y rrs																								
Detección de ADN de leptospiras en las muestras																								
Secuenciación de gen rrs y secY																								
Análisis de los resultados y publicación																								

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

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

Se desarrollarán las actividades en el laboratorio de Biología Molecular del CIDEF (Centro de Desarrollo de Fármacos) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, donde se cuenta con la

Corresponde a Resolución N° 489/2025

infraestructura necesaria (termocicladores, equipo de electroforesis, espectrofotómetro DeNovix DS-11, etc.)

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

Será necesario disponer del Servicio de secuenciación de laboratorio externo. (Empresa Macrogen, Seoul, South Korea o similar)

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

El servicio de secuenciación es indispensable para el control de la puesta a punto de las técnicas moleculares desarrolladas, así como para la identificación de los genotipos de especies de leptospiras presentes en las muestras positivas y para el estudio filogenético de las mismas.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

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

Primer año:

- Bienes de Consumo para qPCR y PCR tiempo final.....\$500.000
- Total primer año..... **\$ 500.000**

Segundo año:

- Bienes de Consumo para qPCR y PCR tiempo final..... \$ 364.000
- Servicio de secuenciación..... \$ 350.000
- Gastos presentación en congreso, publicaciones.....\$ 400.000
- Total segundo año.....**\$ 1.114.000**
- **Total..... \$ 1.614.000**

* 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

- Ahmed, N.; Devi, S. M.; Valverde, M.deL.; Vijayachari, P.; Machang'u, R. S.; Ellis, W. A. y Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 5, 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
- Aymée, L.; Dos Santos Baptista Borges, A.L.; de Souza, G.N. y Lilenbaum, W. (2024) Is microscopic agglutination test a reliable method for diagnosing the bovine genital leptospirosis syndrome?. *Veterinary research communications*, 48, 4185–4189. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10560-4>
- Aymée, L.; Mendes, J. y Lilenbaum, W. (2024) Bovine Genital Leptospirosis: An Update of This Important Reproductive Disease. *Animals*, 14, 322. <https://doi.org/10.3390/ani14020322>
- Aymée, L.; Nogueira Di Azevedo M.I.; dos Santos Baptista Borges, A.L.; Carvalho-Costa, F.A. y Lilenbaum, W. (2022) *Leptospira* spp. strains associated with Bovine Genital

Corresponde a Resolución N° 489/2025

Leptospirosis (BGL). *Microbial Pathogenesis*. 173, Part A, 105841, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105841>.

- Borges, A. L. D. S. B.; Aymée, L.; Carvalho-Costa, F. A.; Lilenbaum, W. y Di Azevedo, M. I. N. (2024). Molecular epidemiology of *Leptospira* spp. serogroup Sejroe associated with chronic bovine leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 298, 110238. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110238>
- Bourhy, P.; Herrmann Storck, C.; Theodose, R.; Olive, C.; Nicolas, M.; Hochedez, P.; et al. (2013) Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3): e2114. doi:10.1371/journal.pntd.0002114
- Correia, L.; Loureiro, A.P. y Lilenbaum W. (2017) Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region. *Veterinary journal*, 220, 63–64. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.016>.
- Ellis, W. A. (2015). Animal leptospirosis. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 99–137. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6
- Hamond, C.; Pestana, C.P.; Medeiros, M.A. y Lilenbaum, W. (2016). Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiology and infection*, 144(1), 72–75. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001363>
- Levett, P. N. (2015). Systematics of leptospiraceae. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
- Libonati, H.; Pinto, P. S. & Lilenbaum, W. (2017). Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. *Microbial pathogenesis*, 108, 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.001>
- Loureiro, A.P. y Lilenbaum, W. (2020) Genital bovine leptospirosis: a new look for an old disease, *Theriogenology* 141: 41–47, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- Martín, L.P. (2018) Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/67994>
- Mazzanti, M.; Scialfa, E.; Rivero, M. y Passucci, J. (2023). Epidemiology of *Leptospira* spp. infection in a beef cattle area of Argentina. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1083024. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1083024>
- Mérien, F.; Amouriaux, P.; Perolat, P.; Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 30(9), 2219–2224. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2219-2224.1992>
- Mori, M.; Bakinahe, R.; Vannoorenberghe, P.; Maris, J., de Jong, E.; Tignon, M.; Marin, M.; et al. (2017). Reproductive Disorders and Leptospirosis: A Case Study in a Mixed-Species Farm (Cattle and Swine). *Veterinary sciences*, 4(4), 64. <https://doi.org/10.3390/vetsci4040064>
- Nally, J. E.; Hornsby, R. L.; Alt, D. P., Bayles, D.; Wilson-Welder, J. H.; Palmquist, D. E. & Bauer, N. E. (2018). Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. *Veterinary microbiology*, 218, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.023>

Corresponde a Resolución N° 489/2025

- Pedrosa, J., Mendes, J., Zambrano, J., Carvalho-Costa, F. A., Di Azevedo, M. I. N., Aymée, L., & Lilenbaum, W. (2025). How Is Bovine Genital Leptospirosis Diagnosed Under Field Conditions?. *Animals : an open access journal from MDPI*, 15(3), 443. <https://doi.org/10.3390/ani15030443>
- Vincent, A. T.; Schiettekatte, O.; Goarant, C.; Neela, V. K.; Bernet, E.; Thibeaux, R.; et al. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Villumsen, S.; Pedersen, R.; Borre, M. B.; Ahrens, P.; Jensen, J. S. y Krogfelt, K. A. (2012). Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *Journal of microbiological methods*, 91(1), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.009>
- Stoddard, R. A. (2013). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 943, 257–266. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_17
- Videla, Y. P.; Quintana, S.; Soto, P.; & Scialfa, E. A. (2025). Isolation of pathogen *Leptospira* sp. from preputial smegma of bull. *Acta tropica*, 269, 107755. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107755>
- Zarantonelli, L.; Suanes, A.; Meny, P.; Buroni, F.; Nieves, C.; Salaberry, X.; et al. (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>
- Zhang, C.; Yang, H.; Li, X.; Cao, Z.; Zhou, H.; Zeng, L.; et al. (2015). Molecular Typing of Pathogenic *Leptospira* Serogroup Icterohaemorrhagiae Strains Circulating in China during the Past 50 Years. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(5), e0003762. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003762>
- Muestreo estratificado. Probabilidad y estadística.net. <https://www.probabilidadyestadistica.net/muestreo-estratificado/> visitado 25/07/2025.
- Estudios transversales: tamaño de muestra para estimación de prevalencia. By [Aprenda estadísticas fácilmente](https://es.statisticseasily.com/tama%C3%B1o-de-muestra-de-estudios-transversales/). Enero 26, 2024. <https://es.statisticseasily.com/tama%C3%B1o-de-muestra-de-estudios-transversales/> visitado 30/07/2025.

Hoja de firmas