

Circulación de leptospiras patógenas en áreas periurbanas y rurales del centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

Exequiel Scialfa¹, Bibiana Brihuega², Mariana Recavarren⁴, Agustín Venzano², Winston Eduardo Morris², Sergio Giamperetti⁵, Sylvia Grune², Silvina Quintana⁴, Graciela Romero², Jorge Bolpe¹, Mateo Schettino³

Resumen

Con el objetivo de identificar portadores de *L. interrogans* en Argentina, se atraparon animales silvestres en la provincia de Buenos Aires, capturando 95 *Rattus norvegicus*, 45 *Didelphis albiventris* (comadrejas), 25 *Chaetophractus villosus* (armadillos), 12 *Lycalopex griseus* (zorro gris), 7 *Conepatus chinga* (zorritos), 3 *Galactis cuja* (hurones), 3 *Myocastor coypus* (nutrias), 3 *Felis geoffroyi* (gato montés), 1 *felis spp.* (gato salvaje) y 1 *Dasyus septemcinctus* (mulitas). Todos fueron testeados mediante el test de microaglutinación, y 47 (25,8%) fueron positivos para *Leptospira* Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Hebdomadis, Pomona y Pyrogenes a títulos de 1:50 y 1:200. Tejido renal de 133 animales fueron cultivados y 28 aislamientos de *L. interrogans* fueron obtenidos a partir de *R. norvegicus* (25/28), de *L. griseus* (1/28), de *C. chinga* (1/28) y de *D. albiventris* (1/28). Los hámsteres inoculados con los aislamientos murieron entre los 4-6 días, observándose lesiones macro y microscópicas en pulmones, riñón e hígado. A través de múltiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), 9 aislamientos presentaron un perfil genético similar a *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, 12 a *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae *Copenhageni*, y una a *L. interrogans* Canicola *Hond Utrecht IV*.

Key words: *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae *copenhageni*, *L. interrogans* Canicola *Hond Utrecht IV*, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, múltiple-locus variable-number tandem repeat analysis, provincia de Buenos Aires y leptospirosis.

Circulation of pathogenic leptospires in suburban and rural areas of center of Buenos Aires province, Argentina

Abstract

To identify carriers of *Leptospira* spp. in Argentina, we trapped wild animals in Buenos Aires province for three nights, capturing 95 *Rattus norvegicus*, 45 *Didelphis albiventris* (white-eared opossum), 25 *Chaetophractus villosus* (big hairy armadillo), 12 *Lycalopex griseus* (gray fox), 7 *Conepatus chinga* (Molina's hog-nosed skunk), 3 *Galactis cuja* (huron), 3 *Myocastor coypus* (otter), 3 *Felis geoffroyi* (forest cats), 1 *felis spp.* (savage cat) y 1 *Dasyus septemcinctus* (mullite). All were tested by microscopic agglutination test, and 47(25.8%) were positive for *Leptospira* Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Hebdomadis, Pomona and Pyrogenes at titers of 1:50 and 1:200. Kidneys from all animals were cultured, and 28 isolate of *L. interrogans* was obtained from *R. norvegicus* (25/28), *L. griseus* (1/28), *C. chinga* (1/28) and *D. albiventris* (1/28). Hamsters were inoculated with the isolates, and died after five and six days, with macroscopic and histopathology lesions in lungs, kidneys and liver. Genotyping through multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) revealed a genetic profile similar to that of RGA Icterohaemorrhagiae serogroup (9 strains), *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae *copenhageni* (12 strains), and one *L. interrogans* Canicola *Hond Utrecht IV*.

Key words: *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae *copenhageni*, *L. interrogans* Canicola *Hond Utrecht IV*, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, Buenos Aires province and leptospiroses.

¹ División Zoonosis Rurales, España 770 (7300) Azul, provincia de Bs As. 54-2281-422953 (email exequielscialfa@yahoo.com.ar)

² Instituto de Patobiología, CCVyA-CNIA, INTA. CC 77 (1708) Morón, provincia de Bs. As., Argentina

³ Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires, Los Patos 126, Tandil (7000), provincia de Bs. As., Argentina

⁴ Instituto de Análisis Fares Taie, Rivadavia 3331 (7600), Mar del Plata, provincia de Bs. As., Argentina

⁵ Servicio de Zoonosis. Hospital F.J. Muñiz, GCBA., Argentina. Uspallata 2272 (1282) CABA.

Introducción

Leptospirosis es una zoonosis que afecta a animales domésticos, silvestres y al ser humano, quien adquiere la enfermedad en forma accidental. La incidencia de la enfermedad en la población humana y animal es muy variable, dependiendo de las condiciones de los ecosistemas (urbano y rural), las variaciones en las condiciones ambientales y la presencia del hospedador. Entre las especies silvestres, los roedores son los reservorios más importantes de leptospiras en la Argentina^{1, 2, 3}. Los animales silvestres son considerados una fuente de infección importante por leptospirosis para los animales domésticos y el hombre^{3, 4, 5, 6, 7}.

En la fauna silvestre, los primeros trabajos realizados en Argentina, intentando el aislamiento del agente fueron efectuados por Spada durante 1919, y en el año 1934 Chiodi aísla la espiroqueta Ictero-hemorrágica de *R. norvegicus*⁸. Estudios posteriores realizados en roedores capturados en Argentina (*R. norvegicus*, *R. rattus*, *A. azarae*, *C. laucha*) permitieron aislar *Leptospira Icterohaemorrhagiae*^{1, 9, 10}; y más recientemente se identificó la presencia de *L. interrogans*, *Canicola* y *Ballum*^{1, 11}. En el año 2005, se estudiaron mediante serología y bacteriología animales silvestres (*Galictis cuja*, *Lycalopex griseus*, *Conepatus chinga*, *Chaetophractus villosus*, *Didelphis albiventris*, *Myocastor coypus*, *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*) capturados en zonas rurales de la provincia de Buenos Aires (ciudades de Azul y Ascasubi) y de Neuquén (Junín de los Andes y San Martín de los Andes) aislando por primera vez en Argentina una cepa perteneciente al serogrupo Tarassovi, a partir de una muestra de tejido renal de *R. norvegicus*^{12, 13}.

Otros estudios realizados en animales silvestres demostraron la presencia de *Leptospira Bataviae* serovar *paidjan* y *Leptospira Canicola* en *Didelphis azarae* y *Didelphis albiventris*¹⁴; *Leptospira Pomona* en *Cavia pamparum*; *Leptospira Canicola*, *Leptospira Sejroe* serovar *hardjo* y *Leptospira Bataviae* serovar *paidjan* y *argentiniensis* a partir de *C. villosus*^{10, 15,16}; y *Leptospira Icterohaemorrhagiae* a partir de *M. coypus*¹.

De acuerdo a la información precedente, la leptospirosis es una Zoonosis endémica en la Provincia con diversidad de reservorios animales, entre los que se incluyen los animales silvestres. Dada la escasa información sobre estas especies, que podrían actuar como reservorios de cepas patógenas de *Leptospiras* para el hombre, las especies domesticas de interés económico y de compañía, se consideró investigar la leptospirosis en animales silvestres con el fin de identificar los animales portadores o reservorios, aislar y caracterizar las cepas actuantes y su patogenicidad a fin de generar información actualizada sobre la enfermedad.

Materiales y Métodos

Con el objetivo de identificar portadores de *Leptospira* spp. in Argentina, fueron atrapados animales silvestres en el período 2005-2012, usando 626 trampas Tomahawk/noche (Tomahawk Live Trap, Co., Wisconsin, USA) en áreas peri urbanas y rurales del partido de Azul y Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Las trampas fueron cebadas con grasa animal y chequeadas todas las mañanas durante dos o tres días consecutivos. Los animales capturados fueron eutanizados de acuerdo a la normativa vigente (Acta de Bienestar Animal, ResCA 087/02, N° expediente: 13) del Comité de Bienestar Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Los animales fueron clasificados como adultos o juveniles en base al desarrollo de los genitales y el tamaño del cuerpo. Los procedimientos de captura y manejo de los roedores se adaptaron a las normas establecidas por Mills y colaboradores¹⁷. Se obtuvieron muestras de sangre para estudios serológicos (test de micro aglutinación con antígenos vivos mantenidos en medios EMJH), y tejido renal para estudios bacteriológicos (cultivo), estudios histopatológicos, y técnicas de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El test de microaglutinación (MAT) fue llevado a cabo con 10 serovares de tres genotipos: *L. interrogans* serovares *canicola*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *pyrogenes* y *wolffi*; *L. borgpetersenii* serovares *castellonis* y *tarassovi*; y *L. kirschneri* serovar *grippotyphosa*, mantenidas en medio Ellinghausen-McCulough-Johnson-Harris (EMJH), Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA. Se consideró como positivo todo suero que reaccionó (50% de leptospiras aglutinadas o no existentes) a una dilución final de

1/50. En caso de positividad, las diluciones siguientes se efectuaron en progresión geométrica de 2 (1/50, 1/100, 1/200, etc).

La extracción del ADN de la muestra se realizó usando distintos procedimientos en paralelo: fenol cloroformo y un Kit comercial "Genomic DNA Purification Kit K0512. Fermentas". Se utilizaron dos juegos de primers G1 y G2, los cuales amplifican un fragmento de ADN (285 pares de bases) de leptospiras patógenas, y no tienen la incapacidad de amplificar el ADN de leptospiras saprofitas (*L. biflexa*).

Para el aislamiento de leptospiras, tejido renal de cada animal fue homogenizado asépticamente dentro de un medio de transporte: solución buffer pH 7.2, conteniendo 200 µg/ml de 5-fluorouracilo como agente selectivo, durante 2 horas. Esta suspensión fue diluida (1:10 y 1:100) con solución salina estéril, y 0.5 ml de cada dilución fue inoculada en medio líquido EMJH. Los cultivos fueron incubados a 28° C durante 90 días, y el desarrollo de leptospiras fue monitoreado semanalmente usando microscopio de campo oscuro¹⁸. El test de patogenicidad fue realizado usando hámsteres jóvenes, de 4 semanas de edad y un peso aproximado de 50 g, los cuales fueron divididos en 2 grupos de dos animales cada uno. Los hámsteres fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0.5 ml de medio EMJH conteniendo 10⁸ leptospiras/ml, mientras que el grupo control fue inyectado sólo con 0.5 ml de medio EMJH. Asépticamente se realizó la necropsia de los hámsteres muertos, y tejido renal y hepático fue preparado para cultivo; además tejido renal, hepático y pulmonar de todos los animales fueron fijados en solución buffer formulada al 10%. Los tejidos fueron procesados por métodos histológicos

de rutina, usando tinción de hematoxilina-eosina. Las cepas aisladas fueron clasificadas mediante serología y métodos moleculares. La MAT fue realizada usando sueros de conejos hiperinmunes preparados en centros de referencia (Institute Superiore Di Sanità, Rome, Italy; The Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands). Serovares representativos de 9 serogrupos de *Leptospira* fueron usados: *L. Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Tarassovi*, *Ballum* y *Grippotyphosa*. La genotipificación de las cepas aisladas se realizó con *múltiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA). Para *L. interrogans* se usaron los VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR19, VNTR23 y VNTR31 loci¹⁹. Para diferenciar genotipos de *L. kirschneri* y *L. borgpetersenii* se utilizaron los VNTR4, VNTR7 y VNTR10 con dos loci adicionales Lb4 y Lb5^{20, 21}. La relación genética entre cepas de *L. interrogans* de referencia nacional y los genotipos aislados desde animales silvestres, se realizó mediante UPGMA clustering análisis, usando MEGA versión 5²².

Resultados

Durante el periodo de estudio se capturaron 194 animales: 95 *Rattus norvegicus*, 45 *Didelphis albiventris* (comadreja), 25 *Chaetophractus villosus* (armadillos), 12 *Lycalopex griseus* (zorro gris), 7 *Conepatus chinga* (zorrinos), 3 *Galactis cuja* (hurones), 3 *Myocastor coypus* (nutrias), 3 *Felis geoffroyi* (gato montés), 1 *felis spp.* (gato salvaje) y 1 *Dasypus septemcinctus* (mulita).

Ninguno de los animales examinados mostró evidencia de enfermedad o lesiones patológicas. Las tasas de captura (animales atrapados/total de trampas/noche x 100) fueron del 13% en áreas rurales y del 29.7% en áreas periurbanas.

Mediante el test de micro aglutinación (MAT) se detectó un 25.8% de positivos (47/182), siendo los serovares *castellonis*, *canicola*, *grippotyphosa* e *icterohaemorrhagiae* los más reactivos. No se detectaron anticuerpos para los serovares *wolffi* y *tarassovi*. Las tasas de positividad fueron variables, observándose una elevada prevalencia (38.2%) en *R. norvegicus*; en cambio, en *F. geoffroyi*, *Felis spp.*, *M. coypus* y *D. septemcinctus* no se detectaron anticuerpos para los serovares utilizados en la MAT. En *L. griseus*, *C. chinga* y *G. cuja* se observaron elevadas tasas de serorreactividad a pesar del bajo número de animales estudiados. Las diferencias observadas con MAT según el área de captura fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$, OR=5.29).

Del total de animales capturados, 133 fueron estudiados por bacteriología para aislamiento. Con las técnicas de siembra de tejido renal se observó el desarrollo y crecimiento de *Leptospira* en el 21% de los cultivos (28/133), obteniéndose en el área periurbana cepas patógenas de *L. interrogans* a partir de

25 *R. norvegicus* y 1 de *D. albiventris* o “comadreja”; y en el área rural, cepas a partir de 1 *C. chinga* o “zorrino” y 1 desde *L. griseus* o “zorro gris”. Las tasas de aislamiento variaron según la especie, siendo del 44% para *R. norvegicus*, del 14.3% en *C. chinga*, del 10% en *L. griseus* y del 3% en *D. albiventris*. Las diferencias observadas mediante el aislamiento del agente a partir de tejido renal, varió según el área de captura, siendo esas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$, OR=54).

Se procesaron muestras de tejido renal de 95 animales para estudios por técnicas de biología molecular, y se identificaron 4 positivos (4.2%); tratándose en todos los casos muestras provenientes de *R. norvegicus* (con MAT y aislamiento negativo) atrapadas en área rural. Los aislamientos a partir del zorro y zorrino fueron PCR negativos.

El aislamiento de la cepa recuperada desde tejido renal de *L. griseus* (zorro) fue identificada por métodos serológicos como *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae. No obstante, mediante métodos moleculares la misma mostró ser un nuevo genotipo (2, 1, 10, 7, 2, 0, 3) según el número de copias de VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR19, VNTR23, VNTR31 loci, con un perfil genético similar que el serogrupo Icterohaemorrhagiae RGA (Figura 1).

Mediante métodos serológicos y moleculares la cepa obtenida de *C. chinga* (zorrino) fue identificada como *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola, con un perfil genético similar a *Hond Utrecht IV* (Figura 1); en cambio, la cepa recuperada desde *D. albiventris* (comadreja) fue identificada como *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar *copenhageni*.

Todas las leptospiras aisladas a partir de *R. norvegicus* fueron identificadas mediante MAT usando suero de conejo hiperinmune de referencia como pertenecientes al serogrupo Icterohaemorrhagiae (títulos de 1/6400). No obstante, a través de métodos moleculares fueron clasificadas dentro del serogrupo Icterohaemorrhagiae con perfil genético similar a *RGA* (9 cepas) y *copenhageni* (12 cepas).

El test de patogenicidad de las 28 cepas aisladas se llevó a cabo mediante la inoculación de hámsters recién destetados, ocurriendo en todos los casos la muerte en 3-6 días post inoculación. Las lesiones anatomopatológicas observadas fueron nefritis intersticial, congestión hepática y congestión y hemorragia pulmonar; la severidad de las mismas varió dependiendo de la cepa. En todos los casos la bacteria fue recuperada post mortem a partir de tejido renal y hepático.

Los hámsters inoculados con la cepa aislada a partir del zorro murieron a los seis días post inoculación. Si bien no se observaron lesiones macroscópicas, la histopatología reveló lesiones de glomerulonefritis, nefritis intersticial con infiltración de células mononucleares y neutrófilos, también con congestión y hemorragia. Las células tubulares se hallaron tumefactas con material proteináceo presente en el glomérulo y en la luz de los túbulos (Figura 4A). En el hígado y pulmones, la congestión fue el cambio más relevante; además se observó neumonía intersticial con hemorragia (Figura 3C).

Los hámsters inoculados con *L. interrogans* Canicola aislada desde el zorrino, murieron a los seis días post inoculación, observándose severas lesiones macroscópicas en los pulmonares (Figura 2B). En los exámenes histológicos se observaron alteraciones estructurales del tejido renal (Figura 4B), hepático y

pulmonar. La histopatología renal mostró una marcada congestión y hemorragia con la presencia de glóbulos rojos en el espacio tubular. En los pulmones, el examen microscópico reveló congestión, severa hemorragia y enfisema. Los capilares alveolares e inter alveolares se encontraban distendidos; se observó la presencia de glóbulos rojos, infiltración de polimorfo nucleares y depósito de material proteináceo (Figura 3B). El hígado se observó muy congestionado.

La cepas recuperadas desde *R. norvegicus* capturados en área peri urbana de Tandil, Buenos Aires, ocasionaron la muerte de los hámsters inoculados al tercer día post inoculación, en la necropsia se observaron áreas multifocales de hemorragia en el parénquima pulmonar (Figura 2A). El examen histológico del tejido pulmonar reveló sangre en el espacio alveolar y células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos) y depósitos de hemosiderina en el intersticio pulmonar (Figura 3A). Las lesiones microscópicas observadas en el tejido renal revelaron una nefritis intersticial. Leptospiras fueron recuperadas de tejido renal (día 16) y hepático (día 20).

En el caso de las cepas aisladas a partir de *R. norvegicus* y *D. albiventris* capturados en área urbana del partido de Azul, Buenos Aires, no ocasionaron lesiones macroscópicas en los hámsters inoculados; la cepa de *R. norvegicus* ocasionó la muerte de los hámsteres a las 72 horas post inoculación, y la de *D. albiventris* a las 84 días. Ambas cepas mostraron lesiones histopatológicas similares, observándose nefritis intersticial aguda multifocal coalescente, no supurativa con degeneración tubular, hemorragia y congestión. En hígado se observó hepatitis difusa con congestión, hemorragia, degeneración y necrosis de los hepatocitos; además se apreció separación de los sinusoides, con abundantes

monocitos y células de Kupffer. En el tejido pulmonar se observó neumonía intersticial aguda con hemorragia, con aumento de la celularidad de los alvéolos por el infiltrado mononuclear.

Discusión

En el centro de la provincia de Buenos Aires, la distribución de animales silvestres varió de acuerdo al lugar de captura, siendo los roedores (*R. norvegicus*) quienes predominaron en el área peri urbana, mientras que las comadrejas (*D. albiventris*) y los peludos (*C. villosus*) fueron los más frecuentes en áreas rurales. Esto influyó en los porcentajes de captura obtenidos en ambas áreas de estudio, siendo superior el obtenido en el área peri urbana (29.7%) respecto al área rural (13%).

Las tasas de positividad fueron mayores en áreas peri urbanas que en rurales; y en los animales estudiados se observó que mediante el test de micro aglutinación se detectó el mayor número de positivos (25,8%), mientras que con los métodos bacteriológicos el 21,1% (aislamiento de 28 *L. interrogans*) y con PCR el 4,3%. Un dato llamativo fueron los casos del zorro y el zorrino con aislamiento positivo que mostraron ser PCR negativos; esto pudo deberse a los métodos de conservación de la muestra, al método de extracción de ADN empleado o bien a una baja carga de material genético presente en la muestra. Respecto a esto último, se podría explicar con el ejemplo del zorro, en el cual el cultivo de tejido renal requirió unos 94 días de desarrollo para que las leptospiras desarrollaran y pudieran ser observadas.

En este estudio se obtuvo el primer aislamiento de leptospiras en nuestro país a partir de zorro gris y zorrino, y el primer aislamiento de *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae en la provincia de Buenos Aires a partir de una comadreja (*D. albiventris*). Los resultados obtenidos reflejan la presencia de diferentes especies animales silvestres (roedores, zorros, zorrinos y comadrejas) portadores

de *Leptospira* patógenas en el centro de la provincia: *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA aisladas a partir de *R. norvegicus* (9/28), *L. interrogans* con un perfil genético similar a Icterohaemorrhagiae RGA desde *L. griseus* (1/28), *L. interrogans* Canicola a partir de un *C. chinga* (1/28), y *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae *copenhageni* aisladas desde *R. norvegicus* (11/28) y de *D. albiventris* (1/28), *L. interrogans* aún sin clasificar a partir de *R. norvegicus* (5/28). Otros estudios realizados en áreas peri urbana de la provincia de Buenos Aires, describen el aislamiento de cepas de *R. norvegicus* y *D. albiventris* con perfiles genéticos desconocidos²³.

La tasa de infección hallada en zorros grises durante este estudio (33.3%) es similar a la hallada en sur América para la especie, donde se observaron la presencia de anticuerpos para *L. interrogans* Canicola, Hebdomadis y Hardjo y *L. kirschneri* serovar *grippotyphosa*, y *L. borgpetersenii* serovares *sejroe*, *tarassovi* y *castellonis*^{4, 13, 24}.

Se conoce relativamente poco acerca de la leptospirosis en los zorritos de Argentina, y escasos son los estudios que se han llevado a cabo a fin de detectar la presencia de anticuerpos. En el año 2006, en la provincia de Buenos Aires, Argentina, se encontró evidencia serológica de infección en estos animales, con una tasa de infección del 43% para *Leptospira* Castellonis, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae y Sejroe¹². Durante nuestro estudio se detectó una tasa de infección en esta especie del 43%, igual a la obtenida durante un estudio en el año 2006. Mediante MAT se observó evidencia de anticuerpos con títulos que oscilaron entre 1:50 y 1:200 para diferentes serovares, correspondiendo el título más elevado para el serogrupo aislado; la reacción

cruzada para varios serovares podría indicar una reciente infección. Nuestro hallazgo de *L. interrogans* Canicola de tejido renal de un zorrino (*C. chinga*), si bien es novedoso por tratarse este animal silvestre de un nuevo hospedador para este serovar en Argentina, son llamativas las manifestaciones clínicas observadas en los hámsteres inoculados con esta cepa, caracterizándose las mismas por congestión y severas hemorragias en los pulmones (hemorragia alveolar difusa) en ausencia de hemorragias en otros órganos. Si bien *R. norvegicus* es la especie frecuentemente capturada en ambientes peri urbanos, las altas tasas de captura obtenidas, llegando en algunos casos al 70%, nos muestran una expansión y proliferación de estos roedores en áreas peri urbana de municipios del centro de la provincia de Buenos Aires. El desordenado crecimiento urbano, la crianza de aves y porcinos, la elevada relación perro/hombre, caninos con hábitos callejeros y la presencia de micro basurales, son factores que influyen en la proliferación de roedores. En esta especie se detectó una tasa de positividad mediante MAT del 37 %, si bien es similar a la obtenida por otros autores, hay que considerar que el título de corte utilizado en el diagnóstico serológico de nuestra investigación fue de 1:50 y no 1:20. En *R. norvegicus* las tasas de aislamiento son muy variadas, y por lo general las cepas aisladas en Argentina correspondieron a *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae.

Los roedores capturados e infectados con *Leptospira* Icterohaemorrhagiae son considerados un importante portador de cepas altamente patógenas, y probablemente un importante factor de riesgo de transmisión para los humanos debido a la proliferación de los mismos en las cercanías de las viviendas ubicadas en áreas peri urbana. Los 28 aislamientos obtenidos durante el estudio, ponen en

manifiesto por un lado la circulación de diversos serogrupos de *Leptospiras* altamente patógenas en la región, y por otro la presencia de nuevos portadores, que cumplirían un rol importante en la epidemiología de la enfermedad. Estas leptospiras antigénica y genéticamente diferentes permitirán realizar posteriores estudios en población humana y animal de la región, mediante la inclusión de las mismas en el panel de cepas utilizadas para el diagnóstico por MAT, comparando la reactividad de las cepas regionales con las actuales de referencia.

Referencias

1. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). Comisión Científica sobre Leptospirosis de la República Argentina. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Editado por Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina, 2006; pp. 13-15.
2. Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridaó G, Gentile J, Gallicchio O. Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42: 126-28.
3. Vanasco NV, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; 60: 227-35.
4. Zamora J, Riedemann S. Wild animals as reservoirs of leptospirosis in Chile. Revision of studies in the country. *Archivos de Medicina Veterinária* 1999; 31: 151-56.
5. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1048-54.

6. Johnson M, Smith H, Joseph P et al. Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1016-22.

7. Vado-Solis I, Cardenas-Marrufo M, Jimenez-Delgadillo B, Alzina-Lopez A, Laviada-Molina H, Suarez-Soliz V, Zavala-Velazquez J. Clinical-Epidemiological Study of Leptospirosis in Humans and Reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44 (6): 335-40.

8. Chiodi E. La Espiroqueta Ictero-Hemorrágica en las Ratas de Buenos Aires. *Rev Soc Arg Biol* 1934; 10: 187-89.

9. Cacchione R. Leptospiras y técnicas de laboratorio. *Rev Inv Ganad* 1962; 14:105-24.

10. Cacchione R, Cascelli E, Martinez E, Zuberuhler J. Aislamiento de una Cepa de *Leptospira Canicola* en un Peludo (*Chaetophractus villosus*). *Rev Inv Agropec* 1966; 4 (3): 51-5.

11. Vanazco NV, Rossetti C, Sequeira G, Sequeira MD, Calderón G, Tarabla HD. First isolations of leptospirae serogroup Ballum serovar *arborea* in Argentina. *Veterinary Record* 2000; 147: 246-47.

12. Scialfa E, Gallicchio O, Benitez M. Leptospirosis. Estudio de brote en un Barrio del Partido de Azul. Año 2004. I Congreso Panamericano de Zoonosis, V Congreso Argentino de Zoonosis y II Congreso Bonaerense de Zoonosis. AAZ, Buenos Aires, 2006; pp 304.

13. Scialfa E, Gallicchio O, Bardón JC, Vizcay R, Koval A, Amiotti P, Díaz M. Primer aislamiento de leptospira serogrupo Tarassovi en *Rattus norvegicus* capturados en Junín de los Andes, provincia de Neuquén, Argentina. XI Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Libro de resúmenes, 2008; pp 83.

14. Brihuega B, Pavan M, Cairó F, Venzano A, Autrey C, Funes D, Romero G, Samartino L. Leptospira patógena en riñón de *Didelphis albiventris* (comadreja). *Rev Arg Microbiol* 2007; 39: 19.

15. Carrillo CG, Myers D, Szyfres B. Bataviae Group Leptospirae Isolated from Armadillos in Argentina. *Trop Geogr Med* 1972; 24: 377-81.

16. Myers D, Cuba Caparo A, Payán Moreno J. Aislamiento del serotipo Hardjo y otras leptospiras de armadillos de Argentina. *Bol Of Sanit Panam* 1977; 83 (1): 56-62.

17. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ. Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta. OPS/OMS 1995; pp 7-12.

18. OPS/OMS. Manual de Métodos para el Diagnóstico de Laboratorio de la Leptospirosis. Nota Técnica N° 30, 1985; pp 9-20.

19. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. *Journal Clinical Microbiology* 2005; 43: 539–45.

20. Pavan ME, Cairo F, Brihuega B, Samartino L. Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2008; 3: 37-45.

21. Pavan ME, Cairo F, Pettinari MJ, Samartino L, Brihuega B. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2011; 34 (2): 135-41.

22. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-39.

23. Grune S, Pavan ME, Suarez O y col. II Encuentro Nacional sobre Enfermedades Olvidadas, XIV Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Buenos Aires; 2011 pp 113.

24. Martino PE, Montenegro JL, Preziosi JÁ et al. Serological survey of selected pathogens of free ranging foxes in southern Argentina, 1998-2001. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004; 23: 801-6.

Conflicto de interés:

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Figura 1. Relación genética entre cepas Argentinas de Referencia de *L. interrogans*, la cepa aislada desde *C. chinga* (Skunk Azul) y el nuevo genotipo aislado desde *L. griseus* (Fox1) usando UPGMA clustering análisis, conducido usando MEGA versión 5.

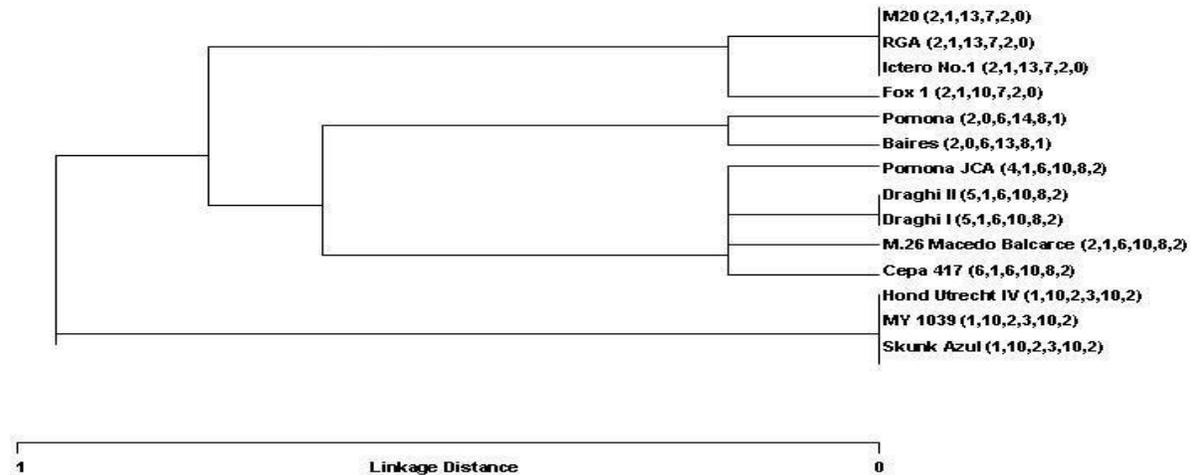


FIGURA 2. Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de hámsteres inoculados con *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae aislada de *R. norvegicus* capturados en áreas periurbana de Tandil, Buenos Aires (A), *L. interrogans* Canicola aislada de *C. chinga* (B) y *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae aislada de *L. griseus* (C) capturados en área rural del partido de Azul, Buenos Aires. Se observan diferentes grados de congestión y de áreas multi focales hemorrágicas en el parénquima pulmonar.



FIGURA 3. Tinción de hematoxilina y eosina de tejido pulmonar de hámsteres inoculados con *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae aislada de *R. norvegicus* capturados en área peri urbana de Tandil, Buenos Aires (A), *L. interrogans* Canicola aislada de *C. chinga* (B) capturado en área rural de Azul, Buenos Aires, y *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae aislada de *L. griseus* (C) capturados en área rural de Azul, Buenos Aires. Se aprecia infiltración de polimorfo nucleares y presencia de sangre en el espacio alveolar (B).

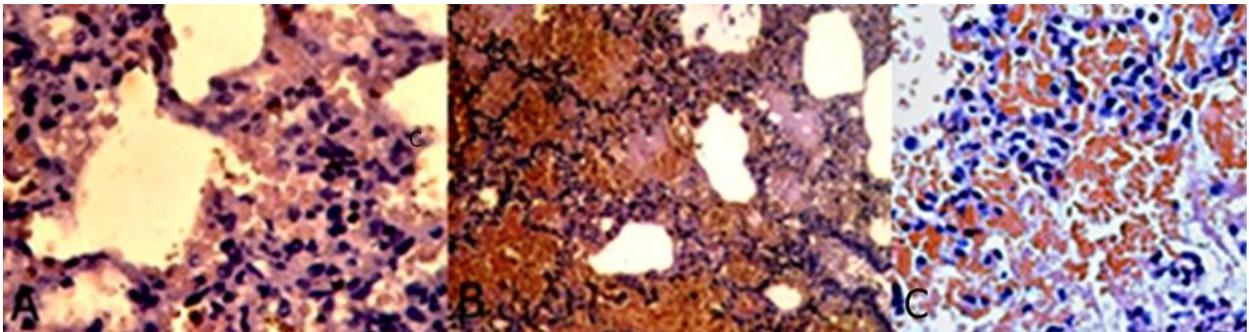


FIGURA 4. Tinción de hematoxilina y eosina de tejido renal de hámsteres inoculados con *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae aislada de *L. griseus* (A), y *L. interrogans* Canicola aislada de *C. chinga* (B) capturados en áreas rurales del partido de Azul, Buenos Aires. Se aprecia glomerulonefritis intersticial, con infiltración de células mononucleares y neutrófilos; se observa además, material proteináceo en el lumen de los túbulos.

