

## INFORME CIENTIFICO DE BECA DOCTORAL

**TIPO DE BECA:** Doctoral

**PERIODO:** 1º año. Desde 01/08/2018 a 31/05/2019

### 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO:* Videla

*NOMBRES:* Yanina Paola

*Teléfono celular:*

*Dirección electrónica:* yaninavidela@gmail.com

### 2. TEMA DE INVESTIGACION:

**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN EL INTERIOR DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES: ROL DE LOS TOROS EN LA TRANSMISIÓN VENÉREA DE LA ENFERMEDAD**

**PALABRAS CLAVE (HASTA 3)** leptospirosis - bovinos - venérea

### 3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

**BECA DOCTORAL 1º AÑO:** *Fecha inicio:* 1-08-2018

**BECA DOCTORAL 2º AÑO:** *Fecha inicio:* -

**BECA DOCTORAL 3º AÑO:** *Fecha inicio:* -

**BECA DOCTORAL 4º AÑO:** *Fecha inicio:* -

### 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA:

Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental - SAMP - UNICEN

Laboratorio de Leptospirosis, Dpto. Zoonosis Rurales. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

### 5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

-

### 6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

Profesor en Escuela de Educación Secundaria Agraria de Azul. Total de horas: 3 hs semanales titulares, 4 hs. Suplente.

### 7. DIRECTOR DE BECA

*Apellido y Nombres:* Soto, Pedro

*Título Universitario:* Dr. en Cs. Veterinaria

## **8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA:**

### **8.1 RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA** *Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.*

Se desarrolla un estudio epidemiológico de la leptospirosis bovina en establecimientos ganaderos del partido de Azul, evaluando la posible transmisión venérea de la enfermedad, a fin de mejorar el monitoreo de casos en la región y planificar estrategias de prevención y control frente a escenarios que predispongan a la ocurrencia de un brote, con pérdidas económicas asociadas. Se determinará la prevalencia de anticuerpos *anti-Leptospira* spp. en bovinos por mediante la técnica de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT). Además, se estudiará la presencia del agente en el tracto reproductivo de machos y hembras mediante bacteriología, biología molecular (PCR en tiempo real) e Inmunofluorescencia Directa, y se analizará la distribución espacial de los casos y se determinarán las variables asociadas a la leptospirosis utilizando los programas QGis 2.10.1, Google Earth, y SaTScan v9.4.2.9.

**8.2 EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO** *Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Las acciones realizadas en el primer año de beca estuvieron abocadas a la validación y prueba piloto de las técnicas a utilizar en el plan propuesto. El objetivo general es caracterizar epidemiológicamente la leptospirosis bovina en establecimientos del partido de Azul, evaluando la posible transmisión venérea de la enfermedad, a fin de mejorar el monitoreo de casos de leptospirosis bovina en la región y planificar estrategias de prevención y control frente a escenarios que predispongan a la ocurrencia de un brote de la enfermedad. Los objetivos particulares planteados incluyen: a) Determinar la prevalencia de anticuerpos *anti-Leptospira* spp. en los bovinos; b) Conocer los serovares más reactivos en las muestras positivas; c) Estudiar la presencia de leptospiras en la mucosa prepucial de toros y mucus cérvico vaginal de vacas mediante Bacteriología, Biología molecular (PCR) e IFD; d) Genotipificar las cepas aisladas y determinar de la patogenicidad de éstas; e) Georreferenciar los establecimientos positivos, analizar la distribución espacial de la seropositividad a los fines de detectar patrones y anomalías y describir los factores de riesgo para los establecimientos ganaderos de la región y por último, e) Medir y analizar la asociación entre los factores de riesgo y la seropositividad.

### **METODOLOGÍA:**

La primera etapa de desarrollo del plan consistió en realizar el contacto pertinente con los veterinarios responsables de establecimientos del partido de Azul, a fin de detectar patrones que sugieran la ocurrencia de leptospirosis en el rodeo. Posteriormente, y con la ayuda de estos, se diseñó una encuesta para recolectar datos de cada establecimiento, a fin de registrar los antecedentes epidemiológicos (geografía del establecimiento, posibles anegamientos e inundaciones) y los antecedentes sanitarios del rodeo (plan de vacunación, ocurrencia de problemas reproductivos, etc.) que permitan obtener indicadores productivos del establecimiento (Anexo 1). Además, se diseñó una plantilla para volcar los resultados, a fin de informar la situación del lugar (Anexo 2).

Se realizó una prueba piloto en la cual se testearon 64 animales provenientes de establecimientos ganaderos (de recría y tambos) del Partido de Azul (36°48' S 59°51' O).

Mediante serología se estudiaron 43 toros y 10 vacas, por bacteriología 54 toros y 10 vacas y por biología molecular 6 toros. Se probó no solo la respuesta de los profesionales en la toma de muestras, sino también la cadena de preservación de éstas desde el campo al laboratorio, y los métodos de descontaminación previo a los procedimientos bacteriológicos.

### **Obtención de muestras:**

Veterinarios matriculados de Azul serán los encargados de extraer las muestras de sangre y de mucosa (prepuccial o cérvico vaginal, según corresponda) de animales de cada sexo, tomados al azar. Para la toma de muestras de ambas mucosas se utilizó el método de aspiración con pipetas de inseminación artificial. El material colectado se transfirió a un tubo con 5 mL de PBS estéril como medio de transporte hasta el laboratorio. Una alícuota se separó y se conservó a -20 para la extracción de ADN, y el contenido restante se procesó para el cultivo microbiológico. Las muestras de sangre, obtenidas de la vena coxígea, se centrifugaron para la obtención del suero y se conservaron en heladera hasta su procesamiento.

### **Demostración de anticuerpos para leptospiras mediante serología:**

Los sueros se analizaron mediante micro-aglutinación microscópica (MAT), con antígenos vivos (serogrupo Canicola (s. canícola), Sejroe (s. Hardjoprajitno y s. Wolffi) Hebdomadis (s. Hebdomadis), Pomona (s. Pomona), Icterohaemorrhagiae (s. Icterohaemorrhagiae y s. Copenhageni) y Pyrogenes (s. Pyrogenes) de *L. interrogans*; Ballum (s. Castellonis) y Tarassovi (s. tarassovi) de *L. borgpetersenii*; y Grippotyphosa (s. grippotyphosa) de *L. kirschneri*. En MAT se partió de una dilución inicial de los sueros de 1:100, y luego de un período de incubación de 1:30 horas a 37°C, se efectuará la lectura microscópica (160 a 200x) en campo oscuro (Sulzer y Jones, 1961). A los positivos se les realizaron diluciones al doble hasta su negativización. Toda muestra con una ausencia del 50% de leptospiras libres respecto al testigo fue considerada positiva.

### **Detección de *Leptospira* spp. en mucosas:**

La detección de leptospiras en mucosas se realizó mediante a) observación directa en microscopio de campo oscuro, cultivo en medio EMJH y detección de material genético mediante PCR en tiempo real. Previo a la siembra, una alícuota de la muestra clínica fue visualizada para determinar la presencia de leptospiras (160 a 200x). Se determinó como mejor método para disminuir la contaminación microbiológica de los cultivos, el agregado de 0.1 ml del antimicrobiano 5 Fluoracilo *overnight* y el filtrado con membrana de 0.45 µm. Por último, se sembraron 0,5 ml del material en medio EMJH líquido y semisólido. Cada cultivo fue incubado por duplicado a 28°C durante 90 días, y el crecimiento de las bacterias fue monitoreado semanalmente mediante microscopía de campo oscuro.

La extracción del material genético se realizó a partir de las muestras de mucosa utilizando el kit comercial "ADN High Pure PCR Template preparation Kit" (Roche, Indianapolis, USA). Los protocolos de amplificación por PCR en tiempo real, desarrollados Recavarren *et al.*, 2014; Recavarren *et al.*, 2015, amplifican fragmentos de los genes LipL32 y rrs (16s ARN).

### **RESULTADOS PRELIMINARES:**

Se detectó positividad mediante algunas de las técnicas diagnósticas utilizadas. El 47% de los toros estudiados presentaron títulos de anticuerpos para *Leptospira* sp., siendo Canícola,

Hardjoprajitno, hebdomadis y wolffi los serovares más reaccionantes. Sólo el 15% de éstos presentó niveles superiores a 1/200. En el caso de las vacas, el 70% presentó serología positiva, con niveles de anticuerpos de 1/100.

El protocolo de cultivo con descontaminación previamente mencionado logró reducir la contaminación de los cultivos del 27 % (11 de 41) al 8% (1 de 13). Se observó crecimiento de *Leptospira* sp. sólo en uno de ellos.

Se testeó la sensibilidad de los protocolos de detección de ADN observándose, de seis muestras de esmegma, resultados positivos en el 67% de los casos para la detección de un fragmento de 87 pb del gen rrs, y el 50% en la detección de un fragmento de 423 pb del gen LipL32.

El registro de los antecedentes obtenidos a través del cuestionario diseñado permitirá, una vez finalizado el muestreo, determinar la asociación entre los factores de riesgo y la presencia del agente patógeno en el establecimiento.

### **IMPORTANCIA DEL PROYECTO CON RELACIÓN A LOS INTERESES DE LA PROVINCIA:**

La provincia de Buenos Aires se caracteriza por su actividad agro-ganadera, aportando el 35% del stock ganadero del país. El partido de Azul es el tercero con mayor cantidad de la provincia (538.986), contando con 1110 establecimientos y 1.522 Unidades Productivas, que incluyen actividad de cría, recría, invernada y engorde a corral. Además, las condiciones climáticas, y la falta de información actual de la incidencia de la leptospirosis bovina en la región la convierten en un escenario propicio para la aparición de potenciales brotes con grandes pérdidas económicas asociadas.

Los resultados preliminares sugieren la circulación del agente patógeno en los rodeos, aún sin la sospecha de la presencia de la enfermedad por parte de los veterinarios y/o productores.

En este sentido, la detección de ADN en esmegma podría ser un primer indicio para la verificación de la hipótesis planteada, sugiriendo la transmisión venérea de la leptospirosis en bovinos, y una potencial muestra para diagnóstico de rutina en toros. Los protocolos diagnósticos implementados podrían incluirse dentro de los estudios realizados durante la revisión de los animales para el diagnóstico de enfermedades reproductivas (Campylobacteriosis Genital Bovina, Tricomoniasis y Brucelosis) que se llevan a cabo de forma rutinaria en los establecimientos, e incluso aprovechar el momento de encierre de animales para la obtención de muestras de esmegma.

En síntesis, se espera que los resultados del presente proyecto aporten información actualizada que permitan mejorar las estrategias de manejo de los rodeos en el interior de la Provincia de Buenos Aires.

## 9. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

### 9.1 PUBLICACIONES. -

### 9.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

Scialfa E., Videla Y., Grune Loffler., Quintana S., Aguirre P., Brihuega B. (2019) Biofilm formation by *Aquaspirillum* spp. and saprophytic *Leptospira* spp. isolated from environmental source of Argentina. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences (JMBFS)* (ISSN 1338-5178)

#### ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease of global distribution, caused by bacteria of the genus *Leptospira*. These spirochetes are living organisms free of mud and water; pathogenic leptospires can survive several days in fresh water when pH and temperature are adequate. During 2016, water samples were collected from Callvú Leovú stream (Azul, Buenos Aires); samples were inoculated in liquid EMJH medium and incubated at 28° C for 90 days. Six isolates of saprophytic leptospires and six of spirils (*Aquaspirillum* spp.) were obtained. The isolates were inoculated in EMJH (liquid and semi-solid) medium and sterile stream water at 4-10° C and 28-30° C; development was observed periodically using dark field microscopy. Both bacteria (alone or together) grew exponentially in first three weeks in all media incubated at 28-30° C; the semi-solid medium was the most efficient at 28-30° C of incubation, and the bacteria remained viable after 16 weeks. At 4-8° C both bacteria remained undetectable but viable in media incubated at 4-8° C for three weeks until the temperature was optimal (thermal stimulation). Leptospires developed in all media used and remained viable for 112 to 168 days (at 4-8° C incubation) in liquid media. The formation of cellular aggregate between *Leptospira* spp. and *Aquaspirillum* spp. was independent at the incubation temperature. These results suggest that *Aquaspirillum* spp. coexists with the genus *Leptospira* in surface waters, and their presence may indicate possible circulation of leptospires.

Keywords: *Leptospira* spp., *Aquaspirillum* spp., biofilm, cell aggregation

*Tipo o grado de participación:* toma de muestras de agua del arroyo Callvú Leovú, realización y seguimiento de cultivos primarios, y mantenimiento de las cepas aisladas. Observación, seguimiento y recolección de datos de los cultivos del ensayo del trabajo mencionado, y colaboración en el análisis de estos (elaboración de gráficos y tablas, etc.).

**9.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.*

**9.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

Título: Importancia de la complementación de diferentes métodos diagnósticos en la confirmación de la leptospirosis bovina.

Videla, Y<sup>1,2</sup>, Scialfa, E<sup>2</sup>, Fernández de Landa, G<sup>2</sup>, Quintana, S<sup>3</sup>, Soto, P<sup>4</sup>.

1. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). 2. Laboratorio de Leptospirosis. Dpto. Zoonosis Rurales. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 4. Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental - SAMP – UNICEN

## Resumen:

La Leptospirosis bovina es causa de pérdidas económicas debido a infertilidad, abortos, nacimientos de terneros débiles y prematuros, y caída de la producción láctea. El diagnóstico debe incluir antecedentes sanitarios y productivos del rodeo y estudios de laboratorio confirmatorios. El objetivo del trabajo fue describir el procedimiento diagnóstico en un establecimiento ganadero del partido de Azul, provincia de Buenos Aires, con sospecha de leptospirosis y porcentajes de parición menores a los esperados (77% en vacas y 40% en vaquillonas). Se estudiaron por bacteriología muestras de orina de vacas abortadas (6), de fuentes de agua, y de esmegma de toros (9); por serología (MAT) toros (9), caninos (5) y humanos (3), y por biología molecular (PCR en tiempo real) muestras de esmegma de toros (9). Se detectó serología positiva en el 67% de los toros, siendo Hardjo, Pomona y Wolffi los serovares más reaccionantes, y en el 40% de los caninos. Se observó crecimiento de *Leptospira spp.* en uno de los cultivos de esmegma. Se detectó la presencia de ADN de *Leptospira sp.* patógena en el 78% de los toros. Los resultados destacan la importancia del estudio integral de la enfermedad en los establecimientos sospechosos y sugieren la utilización de muestras de esmegma prepucial de toros en estudios de rutina del rodeo.

**9.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

Scialfa E; Guevara Ochoa C; Moreno S; Ortiz M; **Videla Y.** *“Distribución geográfica de los casos humanos confirmados serológicamente de leptospirosis (período 2000-2016) en el interior de la provincia de Buenos Aires”.* XXVII Jornadas sobre enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. XXV Jornada sobre cambio global y desarrollo sostenible.

**Videla Y.,** Scialfa E., Guevara Ochoa C, Rivero M, Moreno S; Ortiz M. Asociación entre la demanda de diagnóstico de leptospirosis, la confirmación de casos y el registro de lluvias anuales en la provincia de Buenos Aires (período 2000-2016). Enviado a XVIII Simposio Internacional sobre Enfermedades Desatendidas a realizarse los días 21 y 22 de agosto de 2019 en el Centro Cultural de la Ciencia, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

## 9.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. -

### 10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

#### 10.1 DOCENCIA

**Videla, Y.,** Blanco, N., Merlos, C. *“Resignificación de la enseñanza y aprendizaje de la biología a partir de una experiencia diferente: Participación en la Olimpiada Argentina de Biología”.* V Encuentro Nacional "Formación docente: enseñanza y aprendizaje de las Ciencias de la Naturaleza". Marzo 2019, Facultad de Agronomía (UNCPBA).

**Videla, Y.,** Sosa, M. L., Añorga, A., Biribini, N., Herrera, S. *“Mendel en el campo: proyecto interdisciplinario con cultivos de maíz”.* V Encuentro Nacional "Formación docente: enseñanza y aprendizaje de las Ciencias de la Naturaleza". Marzo 2019, Facultad de Agronomía (UNCPBA).

#### 10.2 DIVULGACIÓN -

#### 10.3 OTROS -

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

**11. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

**Asistente y expositor.** *XXVII Jornadas sobre enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. XXV Jornada sobre cambio global y desarrollo sostenible. La Plata, Argentina.*

*Scialfa E; Guevara Ochoa C; Moreno S; Ortiz M; Rivero M; Videla Y. "Distribución geográfica de los casos humanos confirmados serológicamente de leptospirosis (período 2000-2016) en el interior de la provincia de Buenos Aires". XXVII Jornadas sobre enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. XXV Jornada sobre cambio global y desarrollo sostenible.*

**12. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.*

- **"Taller teórico práctico: "Herramientas de diagnóstico molecular y tipificación genotípica de leptospirosis"** - Instituto de Patobiología, CICVyA INTA CASTELAR. 6 y 7 de Diciembre 2018. Horas acreditadas: 16. Docentes: Dra. Bibiana Brihuega, Dra. Sylvia Grüne Löffler. Con evolución, nota Final: 10 (diez).  
El curso tenía como objetivo "fortalecer el conocimiento de la leptospirosis en animales de producción". El temario incluyó clases teóricas de epidemiología de leptospirosis y técnicas de diagnóstico molecular y tipificación de aislamientos, y análisis filogenético. Además, se recibió entrenamiento práctico de las técnicas de diagnóstico molecular mediante PCR (dúplex y LAMP), preparación y siembra de geles de agarosa y poliacrilamida (SDS-PAGE).
- **Curso virtual: "Biología molecular I" – Fundación WienerLab. Objetivo General:** Capacitar a los profesionales en técnicas relacionadas a plataformas de detección de ácidos nucleicos para su aplicación en la investigación y el diagnóstico biomédico. **Objetivos Específicos:** Capacitación en técnicas PCR de punto final, PCR en tiempo real, sistemas de amplificación isotérmica (NASBA/TMA) y sistemas de amplificación de la señal (branched DNA); Conocer las recomendaciones y lineamientos para el proceso de trabajo desde el diseño de cebadores al análisis de datos en sistemas "in house"; Otorgar criterios para el adecuado diseño y la correcta interpretación de resultados.
- **Práctica en Laboratorio de Biología molecular, Fares Taie (Mar del Plata).**  
Actividades: extracción y purificación de ADN en muestras de cultivos bacteriológicos, sueros bovinos y esmegma prepucial. Detección de ADN de leptospirosis patógenas por PCR en tiempo real. Purificación y secuenciación de productos de PCR para genotipificar aislamientos.
- **Actividades prácticas a campo:** entrenamiento en procedimiento de toma de muestras por raspaje prepucial en toros junto a veterinarios matriculados.
- **Actividades prácticas en el Dpto. de Zoonosis Rurales, Azul. Bs As.** Preparación de medios de cultivo específicos para *Leptospira* spp., establecimiento y seguimiento de cultivos, diagnóstico serológico por microaglutinación de anticuerpos (MAT).

**13. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. -**

**14. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO. –**

**15. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.**

Docencia en nivel medio – Escuela de Educación Secundaria Agraria de Azul. Total de horas: 7 hs semanales.

- Prof. Titular en “Biología, genética y sociedad” (3 módulos semanales)
- Prof. Suplente en “Biología 5” (2 módulos) desde 1/03/2019 hasta 10/07/2019
- Prof. Suplente en “Salud y adolescencia” (2 módulos) desde 1/03/2019 hasta 10/07/2019

**16. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

**17. DESCRIPCION DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.**

El proyecto de tesis doctoral se encuentra actualmente en proceso de evaluación (se adjunta constancia).

La becaria ha realizado tareas de campo, que incluyeron la toma de muestras ambientales y la colaboración en la toma de muestras de origen animal, llevadas a cabo durante la examinación de rutina por el veterinario matriculado a cargo del establecimiento ganadero. Además, se realizaron actividades de laboratorio, como parte de la validación de la metodología a utilizarse en el desarrollo del proyecto y el entrenamiento en las técnicas diagnósticas de rutina.

Actualmente se está desarrollando el muestreo correspondiente a la campaña 2019 (primer año), previsto para los meses mayo a agosto.

Se encuentra en producción el manuscrito que incluye los resultados preliminares obtenidos durante la prueba piloto de la metodología, para ser enviado a revista de alcance nacional o internacional.

**18. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN EL INTERIOR DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES: ROL DE LOS TOROS EN LA TRANSMISIÓN VENÉREA DE LA ENFERMEDAD.**

Concluida la prueba piloto, durante el segundo año del proyecto se espera aumentar el número de animales estudiados por serología, microbiología y biología molecular, teniendo en cuenta que la revisión de rutina de los animales se produce durante los meses Mayo a Agosto, previo al servicio reproductivo. Se profundizará el análisis, con la incorporación de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD) para la detección de la bacteria. Además, se comenzará la tipificación genética y test de patogenicidad de la cepa de *Leptospira* sp. aislada



por cultivo de esmegma bovino. Se analizará la distribución espacial de la seropositividad a los fines de detectar patrones y anomalías y se describirán los factores de riesgo para los establecimientos ganaderos de la región.

## **METODOLOGÍA:**

### **Obtención de muestras:**

Veterinarios matriculados de Azul serán los encargados de extraer las muestras de sangre y de mucosa (prepuccial o cérvico vaginal, según corresponda) de animales de cada sexo, tomados al azar en los establecimientos seleccionados durante dos años. El tamaño de la muestra se calculará utilizando el programa estadístico Epi Info, versión 3.5.3 (2011). El procedimiento metodológico se realizará en el momento de la revisión de los animales para el diagnóstico de enfermedades reproductivas (Campylobacteriosis Genital Bovina, Tricomoniasis y Brucelosis) que se llevan a cabo de forma rutinaria en los establecimientos. Para la toma de muestras de ambas mucosas se utilizará el método de aspiración con pipetas de inseminación artificial. El material colectado se transferirá a un tubo conteniendo 5 mL de PBS como medio de transporte hasta el laboratorio para ser procesadas, dentro de las 2 horas posteriores a la toma, y luego conservadas a -20 °C para la extracción de ADN (Magajevski et al., 2005). Las muestras de sangre se tomarán de la vena coxígea, se centrifugarán para la obtención del suero y se conservarán a -20° C hasta su procesamiento.

### **Demostración de anticuerpos para leptospiras mediante serología:**

Las muestras de sueros se analizarán mediante MAT y se utilizarán cepas vivas de leptospiras (serovares Canicola, Hardjoprajitno, Hebdomadis, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes y Wolffi de *L. interrogans*; Castellonis y Tarassovi de *L. borgpetersenii*; y Grippotyphosa de *L. kirschneri*) mantenidas en medio Ellinghausen-McCulough-Johnson-Harris (EMJH medium: Difco Laboratories, Detroit Michigan USA). En MAT se partirá de una dilución inicial de los sueros de 1:50, y luego de un período de incubación de 1:30 horas a 37°C, se efectuará la lectura microscópica (160 a 200x) en campo oscuro (Sulzer y Jones, 1961). A los positivos se les realizarán diluciones al doble hasta su negativización. Toda muestra con una ausencia del 50% de leptospiras libres respecto al testigo será considerada positiva.

### **Detección de *Leptospira* spp. en mucosas:**

La detección de leptospiras en mucosas se hará mediante a) observación directa en microscopio de campo oscuro, b) detección de material genético mediante PCR en tiempo real, c) inmunofluorescencia directa (IFD) y d) cultivo en medio EMJH.

- a. Observación directa en microscopio de campo oscuro:** una alícuota de la muestra clínica será visualizada para determinar la presencia de leptospiras (160 a 200x).
- b. Detección de ADN de *Leptospira* spp. mediante PCR en tiempo real:** La extracción se realizará a partir de las muestras de mucosa utilizando el kit comercial “ADN High Pure PCR Template preparation Kit” (Roche, Indianapolis, USA), según instrucciones del fabricante. Se llevarán a cabo amplificaciones por PCR en tiempo real en un termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemania), utilizando una mezcla fluorescente EvaGreen preformada y optimizada con los componentes de la reacción

(Master Mix 2X KAPA HRM, Biosystems), exceptuando primers y agua, en un volumen final de 20 µl. Se amplificarán fragmentos de los genes LipL32 y rrs (16s ARN) siguiendo los protocolos validados previamente (Recavarren *et al.*, 2014; Recavarren *et al.*, 2015). Los productos de amplificación serán secuenciados para verificar la amplificación del fragmento esperado. El control de presencia de ADN bacteriano se realizará a partir de la amplificación de una región del gen 16s, utilizando cebadores universales. En cada corrida se incluirán cepas de leptospiras de referencia procedentes de FIOCRUZ-OPS/OMS como control positivo.

- c. Inmunofluorescencia directa (IFD):** La Gammaglobulina anti-*Leptospira* a utilizar será elaborada para este trabajo por BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL), a partir de un suero policlonal que incluirá las cepas de referencias en diagnóstico bovino (aportadas por el laboratorio de leptospirosis del DZR). Se prepararán 10 diluciones del conjugado: 1/25, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 y 1/600. Por otro lado, cada suspensión bacteriana se montará en un portaobjetos de 12 áreas circulares de 7 mm de diámetro. Cada portaobjetos se secará en estufa a 37°C, será fijado con etanol y lavado con agua destilada. Cada área se cubrirá con la respectiva dilución del conjugado y posteriormente se incubará en cámara húmeda durante 1 hora (al resguardo de la luz). Se realizarán 3 lavados (10 minutos c/u) con tampón fosfato salino (PBS). Finalmente se lavará con agua destilada y se eliminará el exceso de humedad. Se agregará una gota de glicerina tamponada pH 8 en cada área del portaobjetos colocando un cubreobjetos. La lectura se realizará en un microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión (100X). Como criterio de positividad se tomará la observación simultánea de la morfología compatible con *Leptospira sp.* y de fluorescencia (Estein *et al.*, 2014).
- d. Cultivo de leptospiras:** Una alícuota de 0,5 mL de cada muestra previamente filtrada utilizando filtros de jeringa de 0,22-0,45 micras de diámetro de poro, se inoculará en medio EMJH (líquido y semisólido) conteniendo 200 µg/ml de 5-fluorouracil como agente selectivo. El cultivo será incubado por duplicado a 28°C durante 90 días, y el crecimiento de las bacterias será monitoreado semanalmente mediante microscopía de campo oscuro. Cada muestra se analizará bajo los siguientes criterios: Se considerará **DETECTABLE** cuando se visualice en el cultivo la presencia de bacterias con morfología acorde al género *Leptospira*, y cuya tipificación genotípica o análisis molecular confirme tal sospecha. Se considerará **NO DETECTABLE** en aquellos casos en que pasados los 90 días no se observe crecimiento bacteriano ni resultados positivos en las pruebas moleculares.

Cuando una muestra sea considerada **DETECTABLE**, se procederá a la i) tipificación y a la ii) evaluación de patogenicidad de la cepa obtenida.

- i. Tipificación genotípica:** Los aislamientos obtenidos serán enviados al laboratorio de referencia de Leptospirosis de la OIE, del INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina; donde serán genotipificados por la técnica de *multiple-locus variable-number tandem repeats analysis* (MLVA), siguiendo la metodología de Majed y col., 2005
- ii. Determinación de la patogenicidad de las leptospiras aisladas:** Las cepas aisladas se inocularán vía intraperitoneal (0.5 ml) en hamsters recién destetados y con un peso aproximado de 50-60 gramos (Faine, 1999). En cada experiencia se utilizarán 2 hámster para el grupo problema (inoculados con medio EMJH conteniendo la cepa aislada) y 2 hámster para el grupo control (inoculados con medio EMJH estéril). La virulencia de las diferentes cepas de leptospiras puede ser variable. Generalmente causa la muerte de los animales entre los 4 a 10 días

post inoculación (Faine, 1999), pero el curso de la enfermedad puede ser inaparente, causando solo la elevación de la temperatura corporal y lesiones que no ocasionan la muerte de los animales (Alexander, 1980). Por tal motivo, los animales inoculados se mantendrán en observación durante 21 días, y luego serán sacrificados (para ello se solicitará el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA). Se recolectarán y seccionarán muestras de tejido renal y hepático para ser sembradas en medios EMJH (líquido y semisólido) e incubados a temperatura de 28°C durante 90 días, y las restantes conservadas en formol al 10% para el estudio histopatológico, según la metodología descrita por (Ham *et al.*, 1985).

### **Análisis de resultados:**

Con los datos epidemiológicos y de laboratorio se elaborará una base de datos con el programa Epi Info, versión 3.5.3 (2011). El análisis de los datos incluirá estadísticas descriptivas y de comparación. Se determinará la prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp., juntamente con la descripción clínica y epidemiológica de los casos positivos. Para efectuar asociaciones entre variables cualitativas se realizará la prueba de Chi<sup>2</sup> o el Test exacto de Fisher (nivel de significancia: 0,05). También se calcularán las razones de prevalencia (RP) y el intervalo de confianza (IC) del 95%.

Se analizará la distribución espacial de la presentación de anticuerpos anti-*Leptospira* y agrupamientos de mayor riesgo para la presentación de las variables asociadas a la leptospirosis. Para el análisis de los agrupamientos de mayor tasa de presentación de cada variable, se utilizará un modelo de Bernoulli (presencia/ausencia) con un nivel de significancia de 0,05, utilizando el programa SaTScan v9.2.



Firma del Director



Firma del Becario

VIDELA YANINA



Dr. Exequiel Scialfa  
DEPARTAMENTO ZOONOSIS RURALES

**Anexo 1**



Laboratorio de Leptospiriosis y de Parasitología  
Departamento de Zoonosis Rurales, Azul  
Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires

**CUESTIONARIO N°:**

**MUESTRAS:**

**DATOS DEL PRODUCTOR/VETERINARIO**

**FECHA:** ...../...../.....

Nombre del dueño: .....

Dirección: ..... Georeferenciamiento: .....

Teléfono: ..... Celular: ..... Mail: .....

**DATOS DEL ESTABLECIMIENTO**

Nombre:.....

Georeferenciamiento:.....

Grupo familiar:

Número de empleados:

**ASPECTOS SANITARIOS**

Vacunas: SI  NO

Especificar:.....

Antiparasitarios: SI  NO

Signos clínicos más frecuentes:

Diarreas		Hemoglobinuria	
Neumonías		Baja producción láctea	
Abortos		Otros	

**TIPO DE EXPLOTACIÓN**

- Tambo
- Carne

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

- Ovinos
- Caninos
- Porcinos
- Equinos
- Fuentes de agua
- Zonas anegables
- Presencia de roedores: SI  NO
- Presencia animales muertos: SI  NO

**ASPECTOS PRODUCTIVOS**

% anual de reposición hembras:.....

Reposición interna ? SI  NO

	Período:	Antecedente:
Duración del servicio		
Total hembras en servicio		
Total hembras preñadas al tacto		
Total hembras paridas		
N° terneros nacidos		
N° terneros destetados		
% anual de reposición hembras:		
% Preñez		
% Partición		
% Destete		

**ANIMALES**

N° Machos:.....

N° Hembras:.....

- Vaquillonas de primer servicio.....
- Vacas.....

**Observaciones:**

---



---



---

**Anexo 2**



Laboratorio de Leptospirosis y de Parasitología  
Departamento de Zoonosis Rurales  
España 770 – TE: 02281 422953  
Azul – Buenos Aires



VETERINARIO:	CANTIDAD:
LOCALIDAD:	ESPECIE:
PROPIETARIO:	
FECHA DE RECEPCION:	

**LEPTOSPIROSIS**

Diagnóstico realizado por la técnica de Micro Aglutinación con antígenos vivos (MAT), desarrollados en E.M.J.H

ID tubo	ID ANIMAL	SEROGRUPOS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

**Referencias:**

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>1- Ballum</li> <li>2- Canicola</li> <li>3- Grippotyphosa</li> <li>4- Sejroe (Serovar Hardjo)</li> <li>5- Hebdomadis</li> <li>6- Icterohaemorrhagiae Copenagheni</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>7- Pomona</li> <li>8- Pyrogenes</li> <li>9- Sejroe (Serovar wolffi)</li> <li>10- Tarassovi</li> <li>11- Icterohaemorrhagiae RGA</li> <li>12- Bataviae</li> </ul> |
|---|---|

**Observaciones:**

**Sello y firma del profesional responsable**