

Rev Panam Salud Publica. 2018; 42: e83.
Published online 2018 Jul 20. Spanish.
doi: 10.26633/RPSP.2018.83: 10.26633/RPSP.2018.83

PMCID: PMC6386106
PMID: [31093111](#)

Language: [Spanish](#) | [English](#) | Portuguese

Primeiro relato da presença de *Leptospira interrogans* em roedores sigmodontíneos *Scapteromys aquaticus*

[Tamara Ricardo](#),¹ [Lucas D. Monje](#),² [Noelia Landolt](#),³ [Yosena T. Chiani](#),³ [M. Fernanda Schmeling](#),³
[Pablo M. Beldoménico](#),² [N. Bibiana Vanasco](#),³ and [M. Andrea Previtali](#)⁴

La correspondencia se debe dirigir a M. Andrea Previtali, andrea.previtali@gmail.com

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Received 2017 Sep 21; Accepted 2017 Dec 19.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 IGO License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. No modifications or commercial use of this article are permitted. In any reproduction of this article there should not be any suggestion that PAHO or this article endorse any specific organization or products. The use of the PAHO logo is not permitted. This notice should be preserved along with the article's original URL.

A leptospirose é uma doença zoonótica de distribuição mundial transmitida pelo contato direto ou indireto com a urina ou os tecidos de animais infectados. Na Argentina, a leptospirose é endêmica na Província de Santa Fé com surtos epidêmicos ocorrendo com as enchentes. Sabe-se pouco sobre o papel dos roedores silvestres na propagação da doença no país. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies hospedeiras de leptospirosas patogênicas em roedores encontrados em um núcleo de povoamento ribeirinho na Província de Santa Fé.

A amostragem dos roedores foi feita no mês de outubro de 2015. Os tecidos dos rins dos animais capturados foram analisados com a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) quanto à presença do gene LipL32 de leptospirosas patogênicas. Para os animais com resultados positivos, foi realizado o teste de microaglutinação (MAT) e tipagem molecular baseada na amplificação do gene 16S rRNA e dois esquemas de tipagem por sequenciamento de locos múltiplos (MLST).

Ao todo, foram capturados 37 roedores das espécies *Akodon azarae*, *Cavia aperea*, *Oligoryzomys flavescens*, *Rattus* e *Scapteromys aquaticus*. O ensaio de PCR-RT foi positivo em um roedor macho da espécie *Scapteromys aquaticus*. Os soros deste animal e dos outros *S. aquaticus* capturados (n = 18) foram analisados com o MAT e os resultados foram não reagentes para os 10 sorovares testados. A amplificação do gene 16S rRNA permitiu identificar a espécie infetante como sendo *Leptospira interrogans* e não houve amplificação nos dois esquemas de MLST.

O achado deste estudo fornece um novo dado quanto à presença de leptospirosas patogênicas em roedores silvestres, importante para esta área por se tratar de uma espécie de ampla distribuição em terras pantanosas e inundáveis da América do Sul.

Palavras-chave: Leptospirose, doenças transmitidas pela água, zoonoses, reservatórios de doenças, *Leptospira interrogans*, Argentina

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira* (1, 2). Las leptospiras se eliminan al medio ambiente por la orina de mamíferos infectados y el ser humano puede contraer la enfermedad al entrar en contacto directo o indirecto con la orina o los tejidos de estos animales (1-3).

En Argentina, el mayor factor de riesgo de la leptospirosis es el contacto persistente con ambientes inundados (1, 2, 4). La provincia de Santa Fe tiene la mayor incidencia anual de leptospirosis en el país y en ella se registran brotes epidémicos durante las inundaciones (1-5).

Actualmente se dispone de escasa información sobre el papel que desempeñan las especies de roedores silvestres como hospederas de leptospiras patógenas en Argentina (3, 6). Por este motivo, el objetivo de este estudio fue identificar las especies hospederas de leptospiras patógenas en los roedores presentes en un asentamiento ribereño de la provincia de Santa Fe, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El asentamiento estudiado pertenece a la comunidad de Los Zapallos en el límite de los Departamentos La Capital y Garay, a unos 30 km al Noreste de la ciudad de Santa Fe, capital de la provincia de Santa Fe de Argentina. Se trata de una zona rural asentada a orillas del arroyo Leyes cuya población se dedica principalmente a la pesca, su acceso a servicios básicos es limitado y su vulnerabilidad a las inundaciones, alta.

En octubre de 2015, se realizó un muestreo de los roedores de la zona. La zona de estudio se dividió en tres sitios según su proximidad al núcleo del asentamiento: centro, borde y natural ([figura 1](#)). En cada sitio se colocaron 25 estaciones de trapeo separadas 15 m, aproximadamente, unas de otras, con una trampa tipo Sherman y una trampa tipo Tomahawk con distintos tipos de cebo por estación. Las trampas permanecieron activas durante tres días, se revisaron diariamente, se repuso el cebo y se reemplazaron las trampas con captura.

Los animales capturados se anestesiaron por inhalación de isofluorano, se les extrajo sangre por punción cardíaca y se eutanzaron por dislocación cervical. Se determinaron la especie, los caracteres morfológicos y reproductivos y se extrajeron los órganos mediante necropsia. Los órganos y sueros obtenidos se trasladaron en un termo de nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su procesamiento en ultrafreezer a -80°C .

El ADN genómico de cada muestra de roedor se obtuvo a partir de 0,1 – 0,2 gramos de tejido renal, utilizando el kit Promega Wizard (Promega Corporation, USA) y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La pureza y la concentración del ADN genómico se determinaron utilizando un espectrofotómetro SPECTROstar Nano con MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany).

Todas las muestras se analizaron por real-time PCR con tecnología SYBR Green. Para descartar la presencia de inhibidores, se realizó una real-time PCR de secuencias de oligonucleótidos altamente conservadas en roedores utilizando los primers 18SR y 18SF (7). La detección de leptospiras patógenas se llevó a cabo amplificando un segmento del gen *LipL32* con los primers LipL32-45F y LipL32-286R (8). El ADN de *Leptospira* se cuantificó comparando curvas de calibración, con diluciones seriadas desde 10^5 hasta 1 bacteria/ μl de control positivo en ensayos independientes.

Las real-time PCR se realizaron en un termociclador StepOne® (Applied Biosystems) con un volumen final de 20 μl por reacción, que contenía 4 μl de buffer Phire 5x, 200 μM dNTP, 0,4 pM de cada primer, 2 μl de 10x SYBR Green I (Invitrogen, USA), 150 ng de ADN y 0,4 μl de enzima Phire Hot Start II (ThermoFisher, USA). El paso inicial de la real-time PCR para *LipL32* consistió en una desnaturalización de 3 minutos a 98°C , seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 98°C , 15 segundos a 53°C y una extensión de 20 segundos a 72°C e incluyeron un control positivo (150ng de ADN de *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrech IV a una concentración de 10^8 bacterias/ml). La real-time PCR de la subunidad ribosómica *18S* se hizo según las especificaciones de Monje, et al. (7). Todas las PCR incluyeron un control negativo de agua ultrapura. Las muestras que amplificaron antes del ciclo 40 para *LipL32* se volvieron a analizar por triplicado para descartar falsos positivos. Todos los tubos de reacción se

prepararon en cabinas de bioseguridad utilizando material estéril y tips con filtro descartables. La comprobación de amplicones mediante geles de agarosa se hizo en otra sala con material descartable y equipamiento exclusivo para tal fin.

Aquellas muestras positivas para real-time PCR del gen *LipL32* se derivaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) donde se realizaron la tipificación molecular y el cultivo. La especie de *Leptospira* se determinó mediante amplificación de un fragmento del gen *16S rRNA* siguiendo el protocolo descrito por Chiani, et al. (9). El primer paso de la PCR consistió en una desnaturalización de 3 minutos a 94°C, annealing a 63°C durante 1,5 minutos y extensión durante 2 minutos a 72°C, seguido de 29 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 63°C y 2 minutos a 72°C. El último paso fue una extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2%. A las muestras que amplificaron el gen *16S rRNA*, se les aplicaron dos esquemas del método Multilocus Sequence Typing (MLST) (9,10). Los productos de secuenciación de PCR *16S rRNA* y MLST se purificaron con GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se secuenciaron por MacroGen Inc (Seoul, Korea). Las secuencias se editaron, ensamblaron, alinearon y analizaron como indican Chiani, et al. (9).

Para realizar el cultivo, se sembraron los riñones macerados en 8 ml de medio Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido. A los cultivos originales se les realizó un repique en otro medio EMJH semisólido, para aumentar la sensibilidad de la técnica y disminuir las contaminaciones. Los cultivos se incubaron a 28°C y se observaron al microscopio de campo oscuro la primer semana y luego mensualmente durante 4 meses (11).

En aquellas especies que tuvieron animales positivos para real-time PCR, se realizó la prueba de microaglutinación (MAT) utilizando los siguientes serogrupos (cepas de referencia): *Castellonis* (Castellón 3), *Canicola* (Hond Utrecht IV), *Grippotyphosa* (Moskva V), *Icterohaemorrhagiae* (M20), *Pomona* (Pomona), *Pyrogenes* (Salinem), *Tarassovi* (Perepelicin), *Sejroe* (Wolfii 3705), *Hardjo* (Hardjoprajitno) y

Hebdomadis (*Hebdomadis*) (12). Los animales se consideraron reactivos a la MAT cuando presentaron títulos de anticuerpos iguales a o mayores de 1:25. El título de anticuerpos se determina cuando se produce la aglutinación del 50% de las leptospiras libres.

Para los procedimientos empleados, se tuvieron en cuenta las sugerencias de la American Society of Mammalogists (ASM) para el uso de animales silvestres en investigación (13). A su vez, el protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Expediente 14 681).

RESULTADOS

Se capturaron 37 animales pertenecientes a las subfamilias *Sigmodontinae*, *Caviinae* y *Murinae*. La rata de pantano *Scapteromys aquaticus* representó 49% de las capturas (cuadro 1) y sólo se capturó en el sitio más cercano a las viviendas (centro).

Del total de animales capturados, se descartaron los resultados de la PCR en una muestra por haber sido negativa en el control interno *18S*. De los 36 animales restantes, solamente un macho adulto de *S. aquaticus* fue positivo a leptospiras patógenas para real-time PCR del gen *LipL32*. La muestra positiva se volvió a procesar por triplicado y se estimó una concentración de 1 leptospira/ μ l de ADN. Se realizó un cultivo del tejido renal sin lograr obtener ningún aislamiento de leptospiras. La especie identificada por amplificación del gen *16S rRNA* fue *Leptospira interrogans*. Se aplicaron los dos esquemas de MLST y todos los genes fueron negativos. No se obtuvieron muestras reactivas para MAT en los *S. aquaticus* capturados.

DISCUSIÓN

El hallazgo de leptospiras patógenas en riñón de *S. aquaticus* es relevante, porque no existían informes previos de infección para esta especie en toda su distribución. *Scapteromys aquaticus* se distribuye en el oeste de Uruguay, sur de Paraguay y de Brasil, y las regiones del Chaco Húmedo, Delta e Islas del Paraná,

Espinal, Esteros del Iberá y Pampeana en Argentina, y muestra preferencia por áreas pantanosas o inundables con vegetación baja (14,15).

Para la provincia de Santa Fe, sólo se habían detectado leptospiras patógenas en roedores introducidos (*Rattus* spp., *Mus musculus* y *Callosciurus erythraeus*) (3,16,17) y anticuerpos contra leptospiras en los sigmodontinos *Akodon azarae*, *Holochilus brasiliensis* y *Oligoryzomys flavescens* (3). A escala nacional, se ha notificado la presencia de leptospiras patógenas en *Rattus* spp., *M. musculus*, *A. azarae* y *O. flavescens* capturados en las provincias de Buenos Aires (6,16,17), Entre Ríos (17) y Corrientes (18).

El roedor que se encontró infectado en el presente estudio era un macho en edad reproductiva que presentaba mordeduras en las orejas, lo que concuerda con informes previos que sugieren que el comportamiento más agresivo de los roedores machos y la presencia de heridas los hace más susceptibles a la infección por leptospiras (19,20). El hecho de que la bacteria se encontrara en el tejido renal del individuo sugiere que esta especie tiene la capacidad de eliminar leptospiras patógenas al medio ambiente.

Si bien se encontró ADN de *Leptospira interrogans* en el riñón de este animal, la bacteria no se pudo aislar mediante cultivo del tejido renal. Esto podría atribuirse a que la conservación del tejido renal a -80°C haya disminuido la viabilidad de las leptospiras, lo que dificulta su crecimiento (11), y a la baja sensibilidad de la técnica (8,10,12). Asimismo, tampoco se pudieron detectar anticuerpos contra leptospiras en el suero de este animal, lo que puede deberse a que se trata de una infección reciente o a que el serogrupo de la cepa infectante no se encuentra representado en el cepario de referencia utilizado en la MAT.

Las técnicas moleculares utilizadas para la tipificación de la bacteria permitieron identificarla únicamente a nivel de especie como *Leptospira interrogans*, ya que los dos esquemas de MLST empleados fueron negativos. Esta negatividad puede deberse a la baja sensibilidad en la amplificación de los siete genes cuando las muestras de ADN no se obtienen a partir de aislamientos (9, 10).

Estos resultados preliminares no permiten saber si *S. aquaticus* es una especie reservorio de leptospirosis patógenas en la zona o si son una fuente de leptospirosis importante para los pobladores de esta y otras comunidades similares. Para esclarecer su papel e investigar la dinámica temporal y espacial de las infecciones con leptospirosis en este roedor, deberían realizarse estudios a largo plazo y en otros lugares de Sudamérica donde se encuentra esta especie. Además, con un mayor número de muestras de los roedores que habitan estas zonas se podrían realizar otros intentos de aislamiento de la bacteria que permitan su tipificación en serovares para poder compararlos con los que están presentes en los casos en humanos.

De todos modos, se considera que el hallazgo de este estudio contribuye notablemente a avanzar en el conocimiento de la ecoepidemiología de la leptospirosis en Argentina por tratarse del primer informe de infección por *Leptospira interrogans* de un roedor silvestre de la provincia de Santa Fe y por la escasez de informes similares en el país.

Agradecimiento.

Los autores agradecen a los estudiantes de la Universidad Nacional del Litoral, Laura Bergero, Franco Abatilli, Jonatan Vega y Sofía Nóbili, su participación en los muestreos. Asimismo, agradecen al Camping Río Hermoso su apoyo y colaboración, y a los residentes de Los Zapallos que les permitieran realizar el estudio en las inmediaciones de sus viviendas. Finalmente, agradecen a los revisores anónimos sus sugerencias, que contribuyeron a mejorar la calidad de este manuscrito.

Footnotes

Financiación. El presente estudio fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral mediante el programa CAI+D Orientado 3.8 Conv. 2013: Socioecología de Leptospirosis.

Declaración. Los autores son los únicos responsables de las opiniones expresadas en el manuscrito, que no necesariamente reflejan la opinión o política de la RPSP / PAJPH y / o la OPS.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud . Boletín Integrado de Vigilancia. (SE19, N119.) Buenos Aires: Ministerio de Salud; 2012. [Acceso el 21 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologiaysituacion>.
2. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005) Acta Trop. 2008;107(3):255–258. [PubMed: 18671932]
3. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. Prev Vet Med. 2003;60(3):227–235. [PubMed: 12900160]
4. Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enría D. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. Rev Panam Salud Publica. 2000;7(1):35–40. [PubMed: 10715972]
5. Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Manattini S, Dalla Fontana ML, Pérez J, et al. Outbreak of human leptospirosis after a flood in Reconquista, Santa Fe, 1998. Rev Argent Microbiol. 2002;34(3):124–131. [PubMed: 12415894]
6. Lovera R, Fernández MS, Jacob J, Lucero N, Morici G, Brihuega B, et al. Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(6):e0005722–e0005722. [PMCID: PMC5509364] [PubMed: 28665952]

7. Monje LD, Costa FB, Colombo VC, Labruna MB, Antoniazzi LR, Gamieta I, et al. Dynamics of Exposure to *Rickettsia parkeri* in Cattle in the Paraná River Delta, Argentina. *J Med Entomol*. 2016;53(3):660–665. [PubMed: 26794232]
8. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):247–255. [PubMed: 19395218]
9. Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, et al. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol*. 2016;37:245–251. [PubMed: 26658064]
10. Weiss S, Menezes A, Woods K, Chanthongthip A, Dittrich S, Opoku-Boateng A, et al. An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):1–11. [PMCID: PMC5031427] [PubMed: 27654037]
11. World Health Organization, Institutional Repository for Information Sharing . Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, IRIS; 2002.
12. Vanasco NB, Vanasco NB, Lottersberger J, Lottersberger J, Sequeira MD, Sequeira MD, et al. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet Microbiol*. 2001;82(3):321–330. [PubMed: 11506926]
13. Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 2011;92(1):235–253.
14. Bonvicino CR, Fernandes FA a., Viana MC, Teixeira BR, D'Andrea PS. *Scapteromys aquaticus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil with comments on karyotype and phylogenetics relationships. *Zoologia*. 2013;30(2):242–247.

15. Barquez RM, Díaz MM, Ojeda RA. Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución. Tucumán: Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos; 2006.
16. Loffler SG, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, et al. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(2):163–167. [PMCID: PMC4015264] [PubMed: 24676656]
17. Marder G, Ruiz RM, Bottinelli OR, Peiretti HA, Zorzo L, Merino DE, et al. Prevalencia de leptospirosis en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Período Mayo 2005-Junio 2008. Rev Vet. 2008;19(2):150–153.
18. Gozzi AC, Guichón ML, Benitez VV, Romero GN, Auteri C, Brihuega B. First isolation of *Leptospira interrogans* from the arboreal squirrel *Callosciurus erythraeus* introduced in Argentina. Wildlife Biol. 2013;19(4):483–489.
19. Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(6) [PMCID: PMC4046967] [PubMed: 24901706]
20. Costa F, Wunder EA, de Oliveira D, Bisht V, Rodrigues G, Reis MG, et al. Patterns in *Leptospira* shedding in Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian slum communities at high risk of disease transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):1–14. [PMCID: PMC4457861] [PubMed: 26047009]

Figures and Tables

FIGURA 1



Sitios de estudio: (I) localización de la provincia de Santa Fe en Argentina; (II) localización del área de estudio dentro de la provincia de Santa Fe; (III) imagen desde satélite de los sitios: (B) borde, (C) centro, (N) natural, Santa Fe, Argentina, octubre de 2015

Fuente: Capas vectoriales de Argentina y Santa Fe proporcionada por Natural Earth y el Instituto Geográfico Nacional (IGN), imagen del satélite Landsat8 proporcionada por US. Geological Survey.

CUADRO 1

Roedores capturados en tres sitios de estudio pertenecientes a la localidad de Los Zapallos, Santa Fe, Argentina, octubre de 2015

Especie	Borde	Centro	Natural
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
<i>Akodon azarae</i>	4 (66,7)	0 (0)	8 (80)
<i>Cavia aperea</i>	0 (0)	2 (9,5)	0 (0)
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	2 (33,3)	0 (0)	2 (20)
<i>Rattus rattus</i>	0 (0)	1 (4,8)	0 (0)
<i>Scapteromys aquaticus</i>	0 (0)	18 (85,7)	0 (0)
Total	6 (100)	21 (100)	10 (100)

Articles from Revista Panamericana de Salud Pública are provided here courtesy of **Pan American Health Organization**