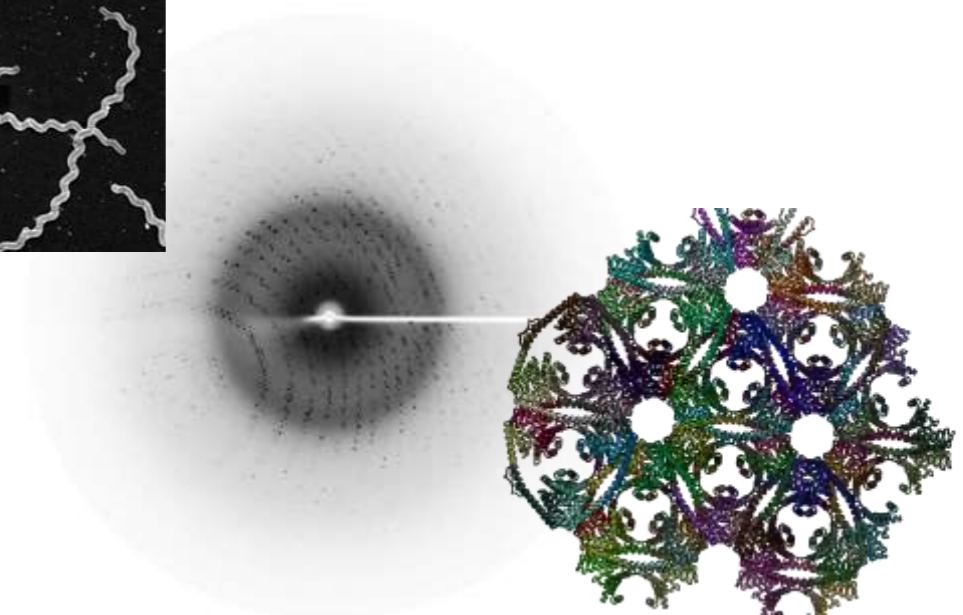
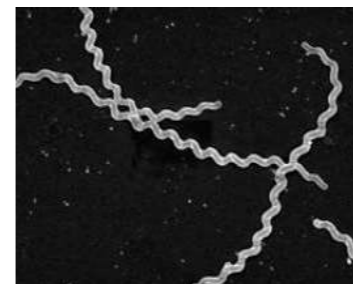




Institut Pasteur
de Montevideo

Leptospirosis : necesidad de conocer lo que tenemos (qué podemos hacer desde la ciencia)

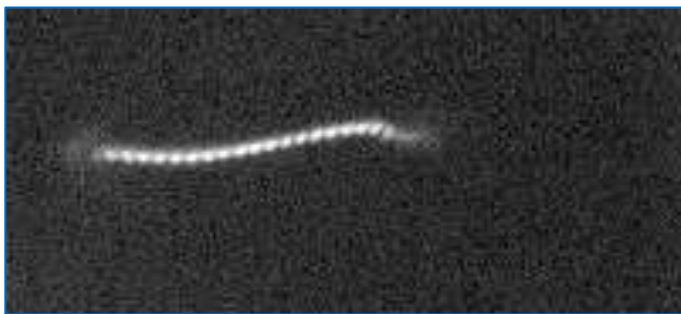
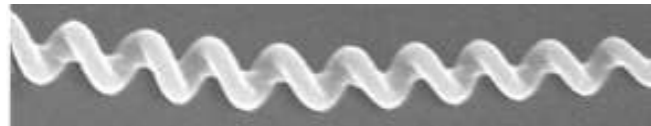


Jornadas de Salud Animal

INIA La Estanzuela - nov 2019

Leptospirosis

- **Enfermedad infecciosa**, causada por varias especies de bacterias del género *Leptospira*



Con forma de espiral, son muy móviles, penetran heridas o mucosas, y **se diseminan en cuestión de horas dentro del organismo.**

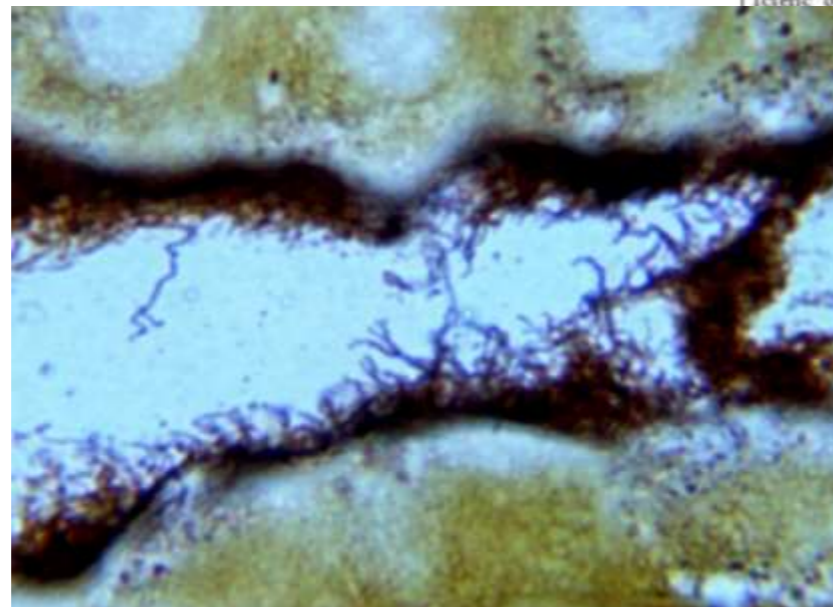
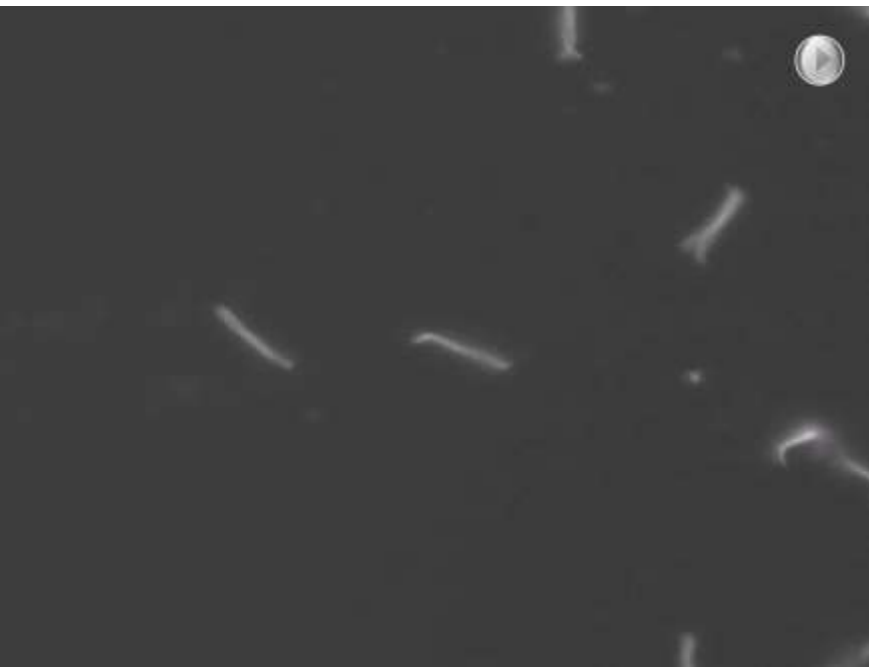
- Desde la sangre, atraviesan tejidos, **se acumulan y afectan al riñón e hígado** (también pueden causar problemas agudos en cerebro, pulmón, ojos, etc)

El género *Leptospira*

34 especies distintas (con >300 serovares o tipos)

10 de dichas especies son patógenas (las otras son inocuas)

...de allí la importancia de identificarlas y tipificarlas

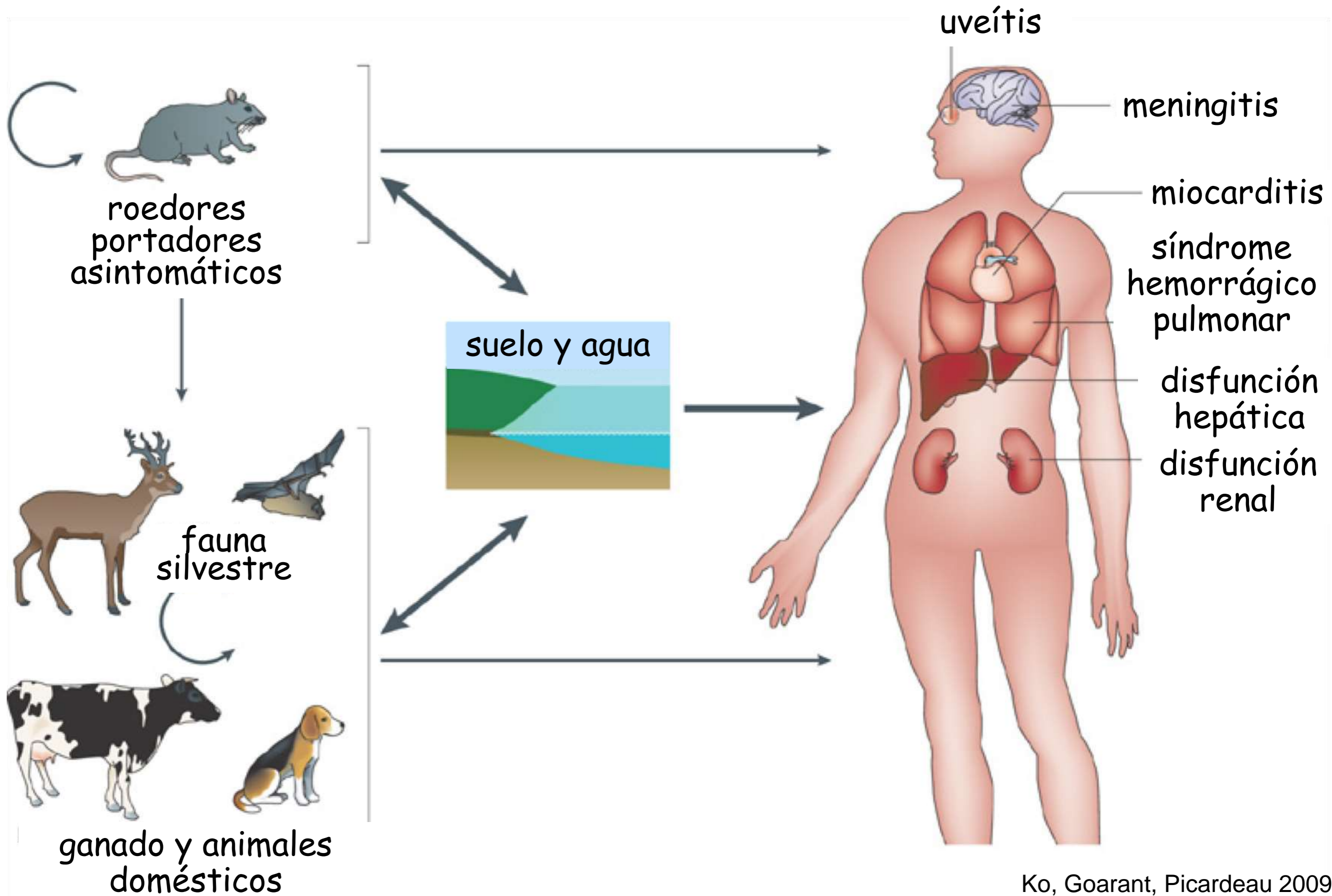


Leptospirosis

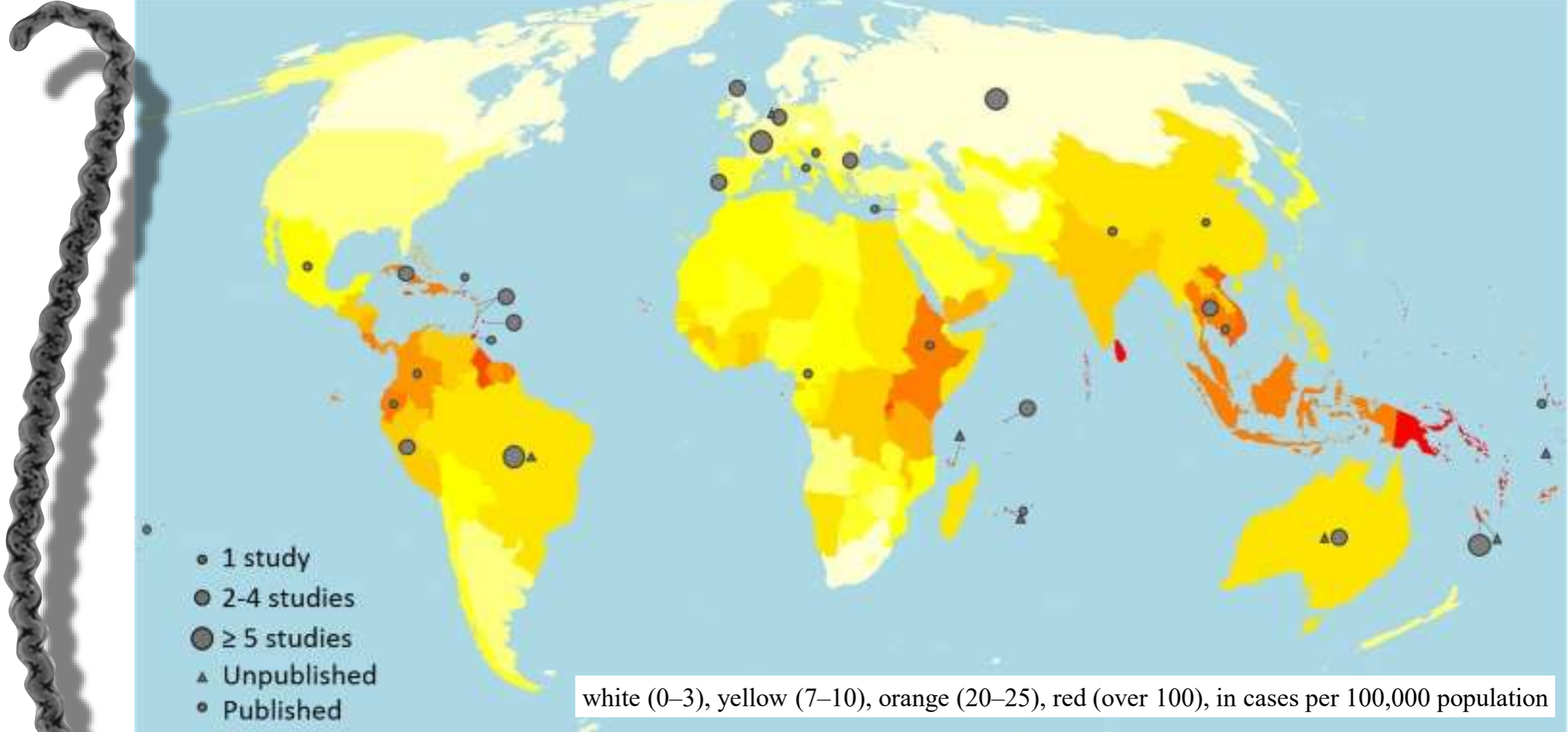
- Es una zoonosis: se contagia entre animales y humanos
- En perros, **humanos**, etc \implies enfermedad aguda, puede ser **muy severa**.
- En **bovinos**, algunos roedores, etc \implies **infección crónica**, con o sin signos clínicos

La severidad también depende de la leptospira : algunas son más virulentas que otras, incluso algunas están "aclimatadas" a ciertos hospederos

Leptospirosis : ciclo de diseminación



Leptospirosis humana : enfermedad "desatendida" y de alcance global



- **>1.000.000 casos de leptospirosis/año**
- **Tasa de mortalidad del ~6-10%**
 - Regiones tropicales y templadas
 - Países desarrollados y en desarrollo
 - Escenarios rurales y urbanos

Costa F et al. 2015 PLoS NTD
Torgerson PR et al. 2015 PLoS NTD

Leptospirosis en Uruguay

- **En humanos:** ligado a ámbitos rurales; mediciones de incidencia variables (llegando a **~15 casos cada 100.000 habitantes**); con internaciones en CTI todos los años y decesos

En bovinos:

- 25-50% animales positivos
- 50-70% de los predios
- Enfermedad crónica en animales adultos, causa problemas reproductivos (abortos, repetición de celo); merma de leche; enfermedad aguda en terneros, incluso muerte

distintas estimaciones: 15.000 a 90.000 abortos/año causadas por infección por leptospira (sobre ~2.8M pariciones, y ~300.000 abortos totales)

Leptospirosis : su control

- Responde a antibióticos (tetraciclinas, β -lactámicos, etc), pero hay **fuerte interés por contar con vacunas eficaces**
- **Una vacuna ayudaría a:**
 - prevenir uso excesivo de antibióticos que favorecen aparición de bacterias resistentes,
 - reducir costos para el productor,
 - controlar la zoonosis disminuyendo la diseminación a humanos.

Los **mecanismos** que usan las leptospiras para provocar la enfermedad (**patogénesis**) y para regular su virulencia (**agresividad**) no se conocen aún !!

Desafíos de investigación cuando comenzamos en 2015

- **gran cantidad de serovares:** problemas para diagnóstico; afecta eficacia de vacunas disponibles (*OIE recomienda formular vacunas con serovares prevalentes en la región*)
- desconocimiento de cuáles infectan al ganado en Uruguay (**necesidad de identificar** para elaborar vacunas eficaces)
- **no había ningún aislamiento** a partir de animales infectados : no habíamos podido ver al agente infeccioso, y determinar especie y serovar directamente
- **los métodos diagnósticos por serología (MAT)** disponibles en Uruguay son específicos, pero poco sensibles y **no diferencian animales vacunados de infectados/enfermos**

Desde 2015 : proyecto multi-institutional "Aislamiento y tipificación de cepas de Leptospira, hacia el desarrollo de mejores vacunas"

- Se trabajó por 4 años en colaboración entre :
 - Ministerio de Ganadería MGAP (DILAVE)
 - la Universidad UdelaR (Fac de Medicina)
 - INIA
 - Inst Pasteur de Montevideo
 - 3 lab industriales (productores de vacunas)



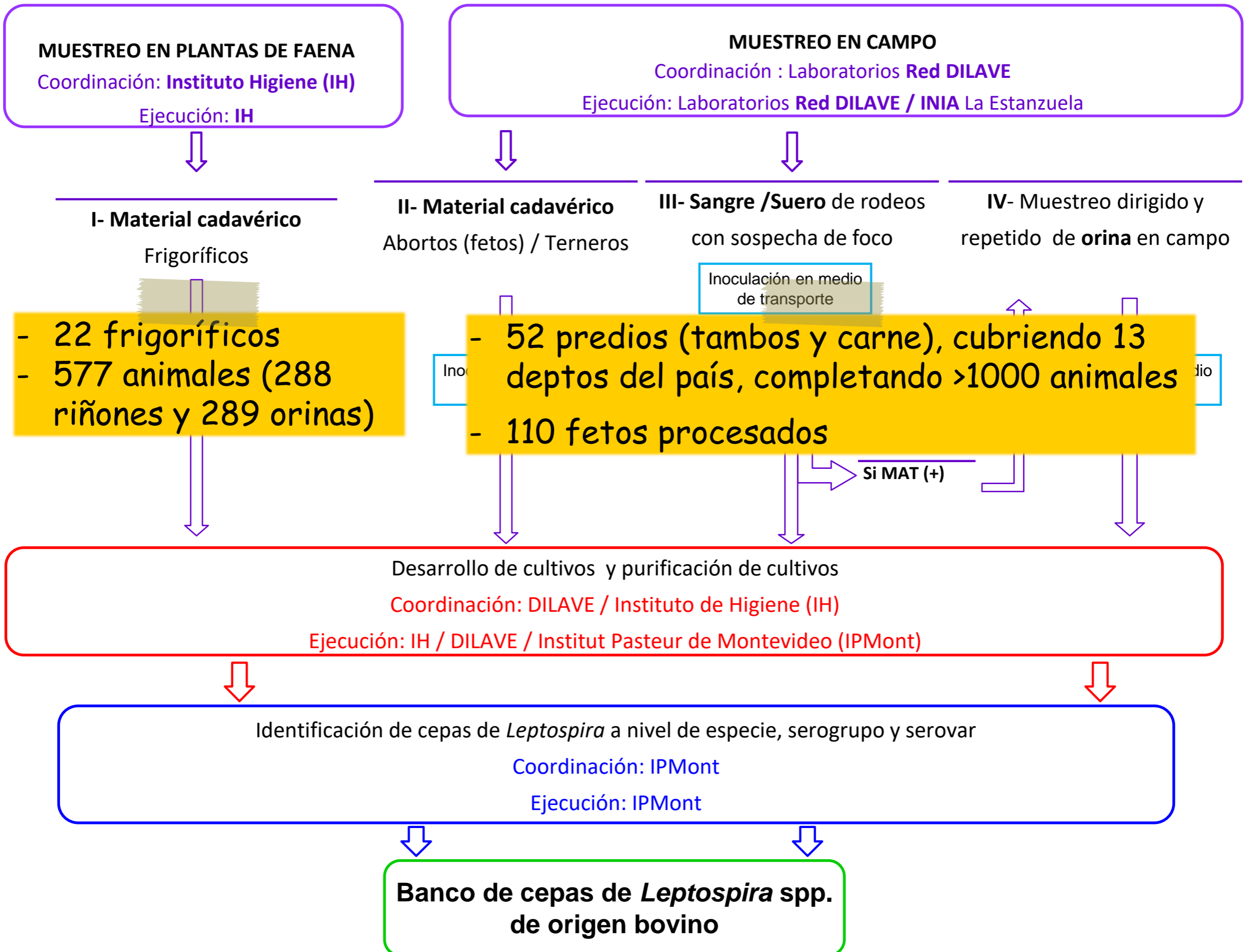
UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



LOGROS

- 1- Fortalecimos las capacidades tecnológicas nacionales para el abordaje de la leptospirosis bovina
- 2- Obtuvimos mediante cultivo y aislamiento microbiológico >60 cepas de *Leptospira* spp. patogénas provenientes de ganado bovino (a campo, y de frigoríficos) cubriendo distintas regiones del país.
- 3- Tipificamos esos aislamientos mediante métodos serológicos y moleculares; se entrenaron profesionales de centros diagnósticos (INIA, MGAP) y se transfirieron métodos moleculares de diagnóstico
- 4- Creamos un banco de cepas de *Leptospira* spp. provenientes de casos de leptospirosis bovina, representativas de los serovares circulantes en el territorio nacional

Protocolo de muestreo y aislamiento de cepas



Identificación y tipificación de cepas aisladas

- ✓ Determinación de **especie** y de variedad (**serovar**) : métodos serológicos y moleculares
- ✓ **Conservación de cepas** en nitrógeno líquido
- ✓ **Registros** digitales con fichas de ingreso y seguimiento



Taller “*Hands-on training Workshop: isolation of Leptospira spp. from cattle samples*”
13-17 de octubre 2014

23 participantes ; con trabajos prácticos en campo y en laboratorio ; clases teóricas y sesiones de discusión ; profesores invitados de la Univ de Massey (Nueva Zelanda)
Peter Wilson y Julie Collins



Taller “*Técnica de Inmunofluorescencia Directa*”

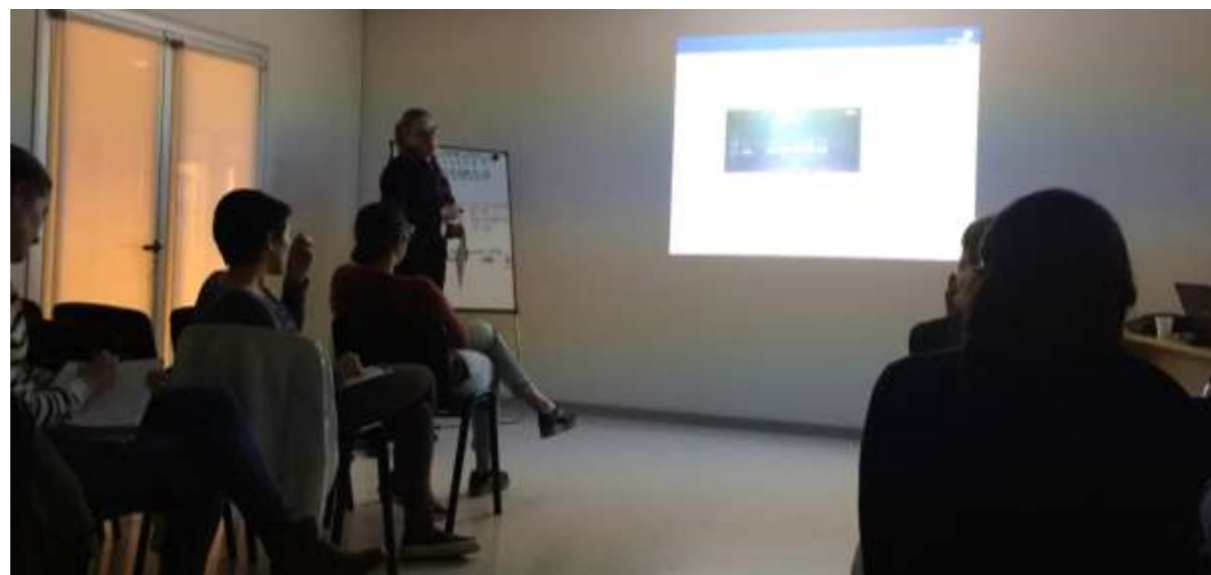
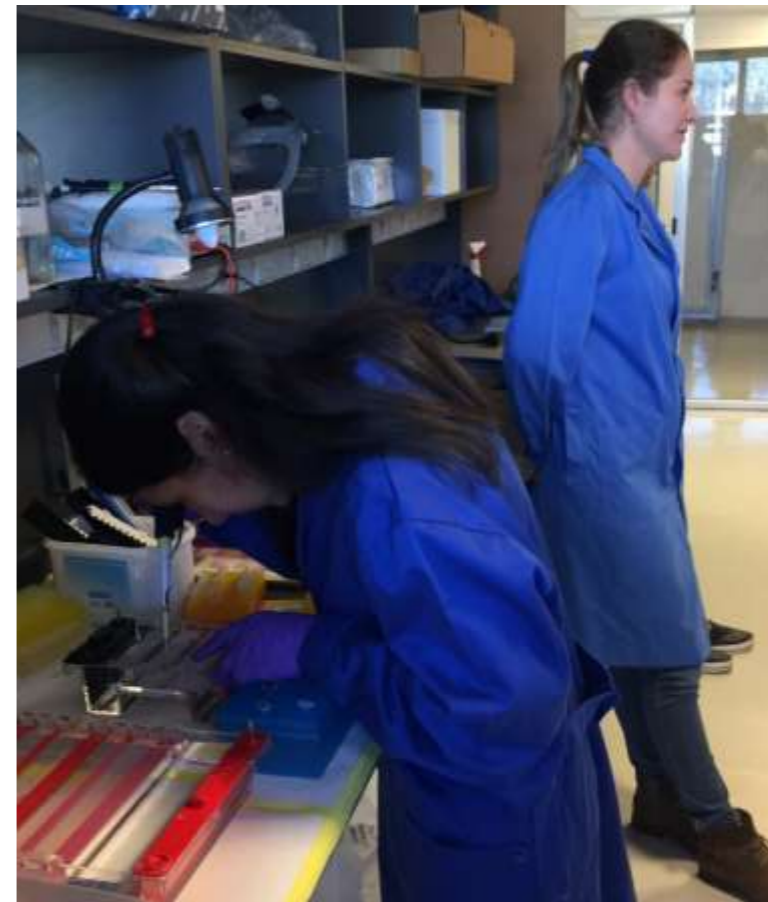
29 noviembre 2016

7 participantes : laboratorios de diagnóstico DILAVE (Treinta y Tres y Montevideo), IH-UdelaR y plataforma INIA de Investigación en Salud Animal



Taller “*Aplicación de métodos moleculares al diagnóstico de leptospirosis: amplificación del gen lipL32 específico de especies patógenas del género Leptospira*”
3-4 de mayo 2017

16 participantes : laboratorios de diagnóstico DILAVE (Paysandú, Treinta y Tres y Montevideo), UdelaR y de la plataforma INIA de Investigación en Salud Animal



- Cuatro tesis (doctorado y maestrías) defendidas y en preparación
- 4 artículos publicados en revistas internacionales

RESEARCH ARTICLE

Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis

Leticia Zarantonelli^{1,2}*, Alejandra Suanes³*, Paulina Meny⁴*, Florencia Buroni⁵*, Cecilia Nieves^{1‡}, Ximena Salaberry^{3‡}, Carolina Briano^{6‡}, Natalia Ashfield⁴, Caroline Da Silva Silveira⁷, Fernando Dutra⁶, Cristina Easton³, Martin Fraga⁷, Federico Giannitti⁷, Camila Hamond^{2,7}, Melissa Macías-Rioseco⁷, Clara Menéndez⁴, Alberto Mortola³, Mathieu Picardeau^{8,9}, Jair Quintero⁴, Cristina Ríos⁴, Víctor Rodríguez⁵, Agustín Romero⁶, Gustavo Varela⁴, Rodolfo Rivero^{5*}, Felipe Schelotto^{4*}, Franklin Riet-Correa^{7*}, Alejandro Buschiazzo^{1,9,10*}, on behalf of the Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium^{†1}

1 Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, **2** Unidad Mixta UMPI, Institut Pasteur de Montevideo + Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Montevideo, Uruguay, **3** Departamento de Bacteriología, División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Sede Central, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay, **4** Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **5** División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Noroeste, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Paysandú, Uruguay, **6** División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Este, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Treinta y Tres, Uruguay, **7** Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay, **8** Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France, **9** Joint International Unit « Integrative Microbiology of Zoonotic Agents » IMiZA, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay / Institut Pasteur, Paris, France, **10** Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France



 OPEN ACCESS

Citation: 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 Negl Trop Dis 12(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>

[pntd.0006694](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694)

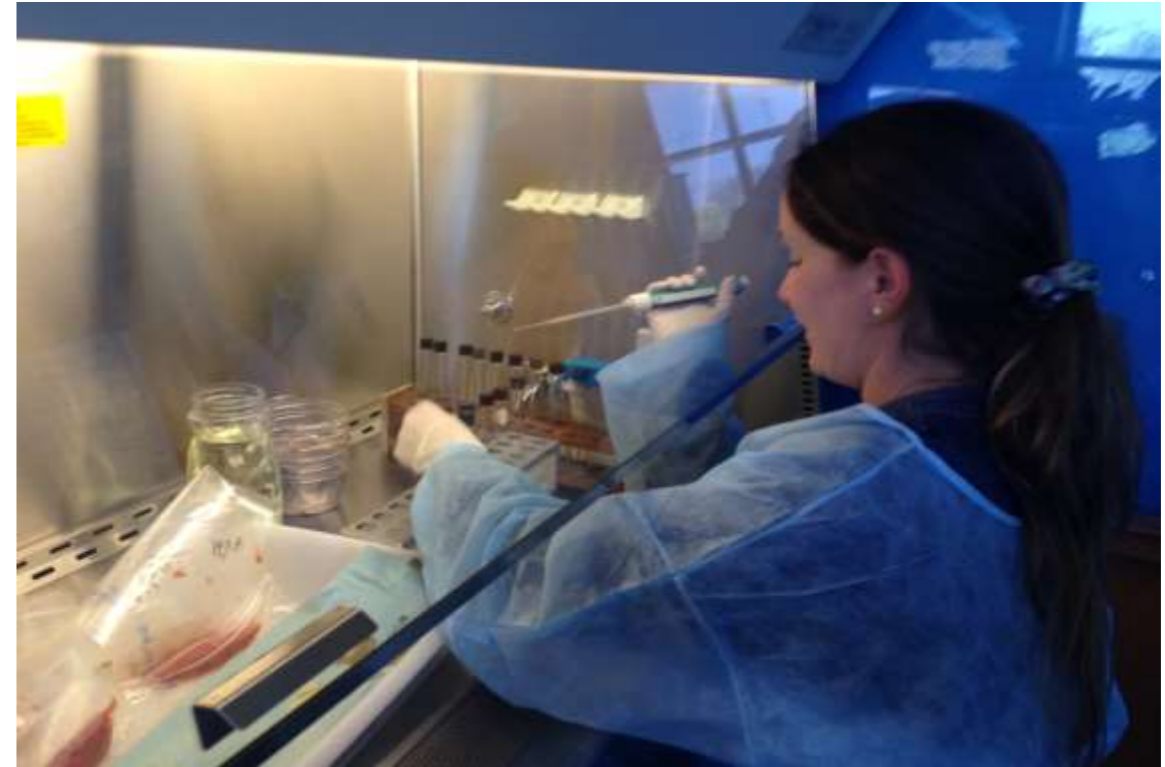
Muestreo de Campo



Fotos: A. Suanes

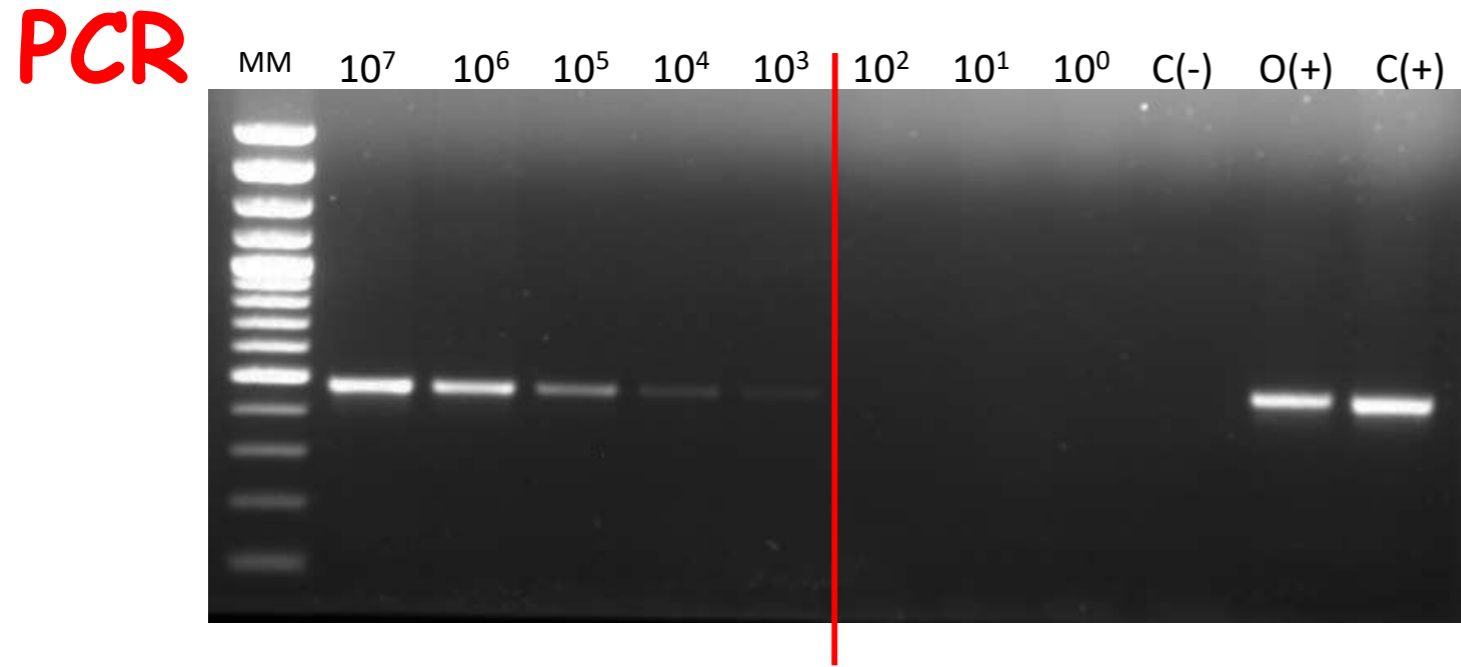
...y en frigoríficos

Procesamiento de muestras en el laboratorio



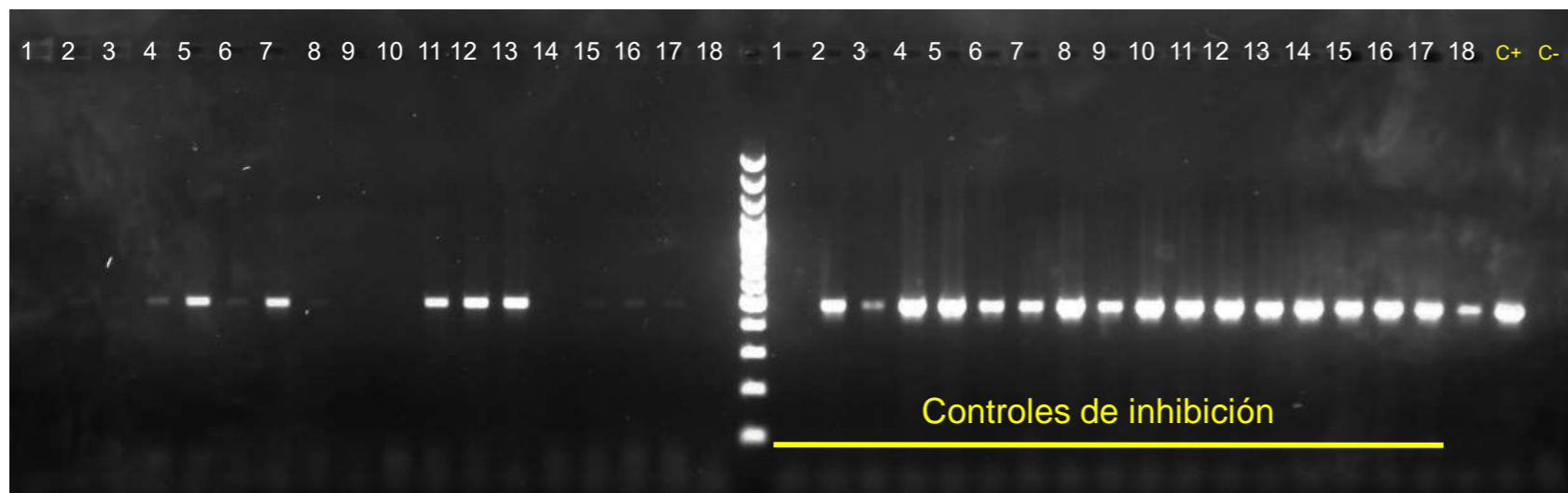
Fotos: A. Suanes

Técnicas moleculares que complementan y mejoran el diagnóstico



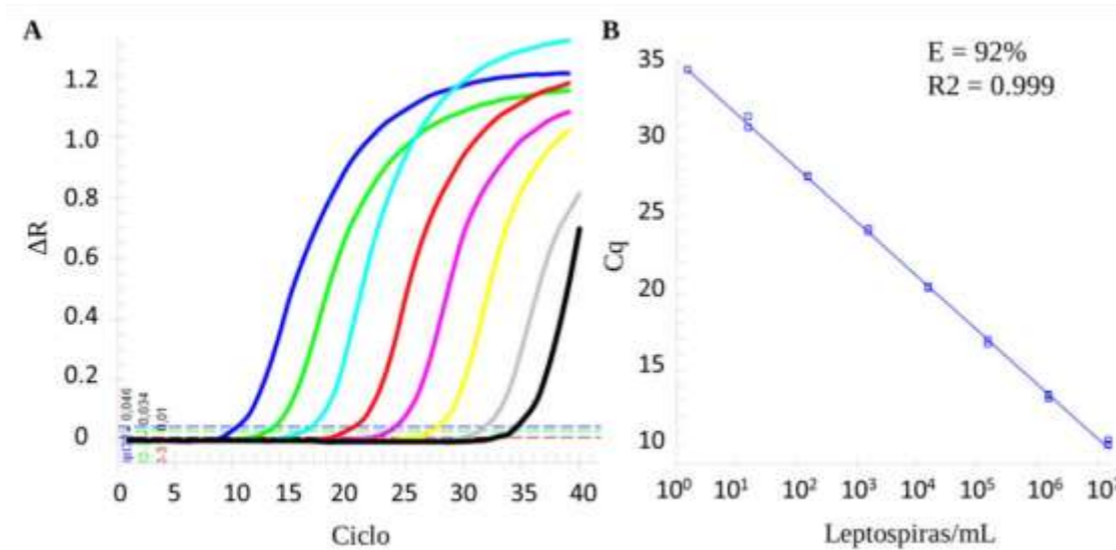
LÍMITE DE DETECCIÓN:
1000 leptospiras

Validación en muestras de orina, sangre, órganos (líquido abomasal, riñón, hígado) y cultivos en desarrollo



Técnicas moleculares que complementan y mejoran el diagnóstico

PCR en tiempo real



LÍMITE DE DETECCIÓN:
10 leptospiras

Alta especificidad (sólo detecta leptospiras patógenas)

Validación en muestras biológicas, incluyendo riñones de jabalí, donde se detectó un 16% de jabalíes infectados con Leptospira spp. patógenas (Nieves et al. 2018 ms en preparación)

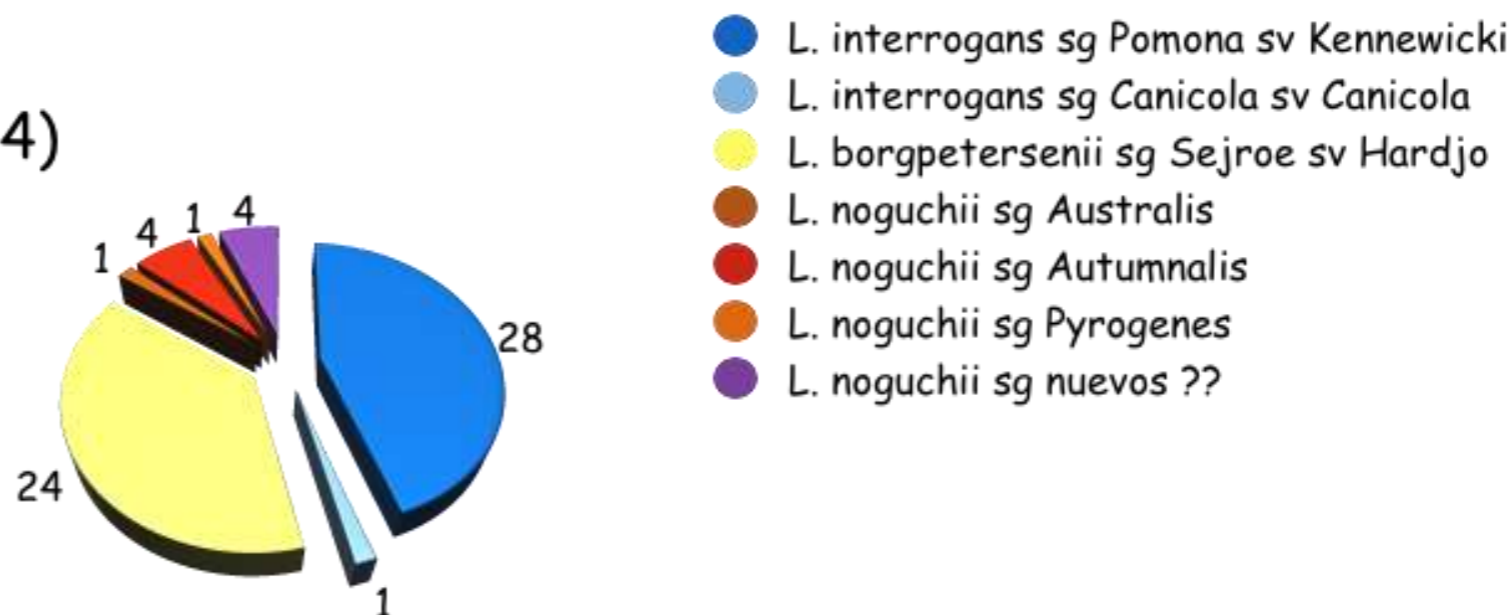
63 aislamientos, la mayoría tipificados hasta serovar

Aislamientos totales : 63

46% *L. interrogans* (29)

38% *L. borgpetersenii* (24)

16% *L. noguchii* (10)



Aislamientos en frigoríficos : 11

27% *L. interrogans*

46% *L. borgpetersenii*

27% *L. noguchii*



Aislamientos a campo : 52

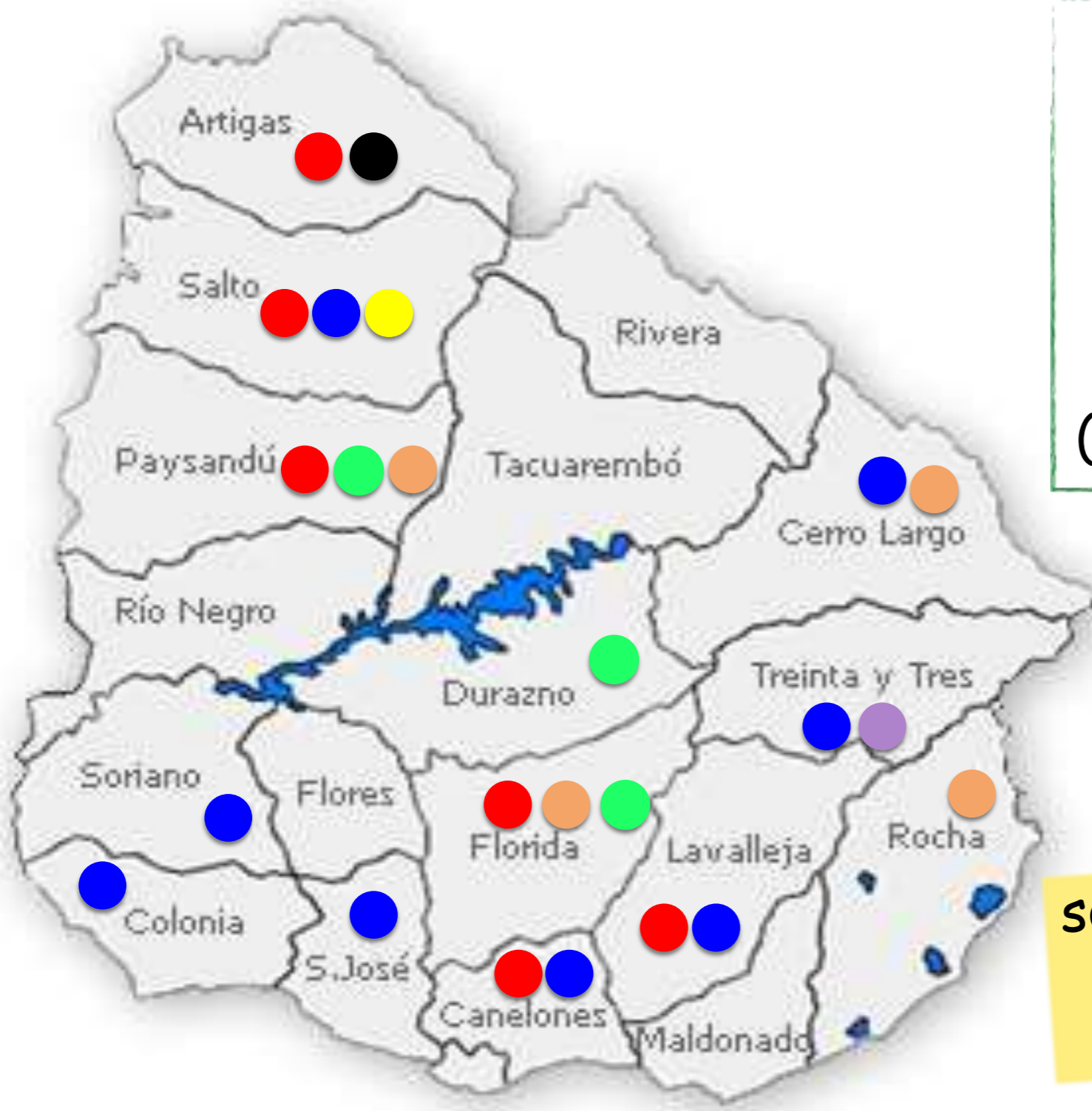
50% *L. interrogans*

36% *L. borgpetersenii*

14% *L. noguchii*



22% de los animales adultos, y
8% de los fetos abortados,
están infectados con variantes
patógenas de *Leptospira*
(~80% de los predios muestreados)



sólo 2 de las variantes encontradas
están incluídas en las vacunas
disponibles en Uruguay

● *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo
● *L. interrogans* Canicola Canicola
● *L. interrogans* Pomona Kennewicki

● *L. noguchii* Australis
● *L. noguchii* Autumnalis (4 variantes)
● *L. noguchii* Pyrogenes
● *L. noguchii* ND

¿Cómo funcionan las vacunas?

(tanto en animales como en humanos)

1. Se inyecta la vacuna, que contiene los microorganismos que producen la enfermedad previamente debilitados.

2. Esta administración hace que el sistema inmunológico desarrolle una respuesta y produzca anticuerpos para luchar contra esa clase de microorganismo.

3. Los anticuerpos eliminan los microorganismos que supuestamente producirían la enfermedad.

4. Los anticuerpos utilizarán la misma respuesta cuando nuestro cuerpo se enfrente al microorganismo con el que nos vacunamos.



- ✓ las vacunas anti-leptospirosis funcionan inyectando bacterias enteras muertas
- ✓ esas bacterias deben ser de los serotipos que circulan en región (si no, no protegen)
- ✓ las vacunas eficaces pueden eliminar serotipos y permitir la entrada de otros nuevos : vigilancia y eventual reformulación



BOVISAN LEPTO 8

Descripción: Vacuna inactivada para la prevención de leptospirosis.
Composición: Suspensión inactivada de Leptospira icterohaemorrhagiae, pomona, canicola, wolffi, hardjo bovis, hardjo praetense, tarassovi y grippityphosa absorbidos en hidróxido de aluminio al 10%.
Especies: BOVINOS, OVINOS y SUINOS.
Indicaciones: Indicado para la inmunoprofilaxis y control de leptospirosis.
Via de Administración: INTRAMUSCULAR

Virbac ANIMAL HEALTH

Lepto 2-Way

FOR THE VACCINATION OF CATTLE AGAINST LEPTOSPIROSIS

Net Contents: 200ml. (250 doses)

Experiencia exitosa en Nueva Zelanda

- a fines de los '70 estudiaron serovares de *Leptospira* circulantes y adecuaron las vacunas a esas cepas
- en los '80 se hizo seguimiento: disminución de abortos, y de excreción de leptospiras en la orina del ganado
- disminución de la incidencia de leptospirosis humana !
- los productores fueron centrales en motorizar dicho desarrollo (Univ Massey, McKintosh, Wilson, Sanhueza et al)

Marshall R.B. Isr J Vet Med 1987 ;43:271-6
Thornley CN, et al. Epidemiol Infect. 2002;128:29-36
Sanhueza J. Tesis 2016 Massey Univ

Desafíos para la ciencia, en beneficio de la salud

DIAGNÓSTICO

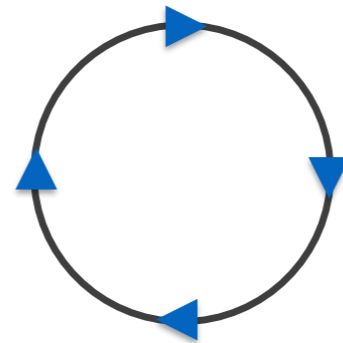
- nuevos métodos, más rápidos y precisos
- desarrollar formas de confirmar cuándo un aborto es causado por *Leptospira*

DESARROLLO DE VACUNAS

- medir eficacia de las vacunas disponibles en Uruguay
- reformular vacunas con cepas autóctonas (mercado regional)
- innovación: vacunas a subunidad

EPIDEMIOLOGÍA

- impacto de la leptospirosis en abortos y merma de productividad
- incidencia en salud humana (especialmente en el medio rural)



CIENCIA BÁSICA

- descubrir los mecanismos de patogenicidad de las leptospiras
- encontrar las bases moleculares de la regulación de virulencia

Vacunas veterinarias

trabajo conjunto investigación/industria/estado/productores



Agradecimientos

DILAVE (Treinta y Tres)

Carolina Briano

Agustín Romero

Fernando Dutra

DILAVE (Montevideo)

Alejandra Suanes

Ximena Salaberry

Gimena Avila

Natasha Barrendeguy

Nora Negrin

Alberto Mortola

Cristina Easton

Alvaro Núñez

DILAVE (Paysandú)

Florencia Buroni

Víctor Rodríguez

Lucía Grille

Edgardo Giannechini

Rodolfo Rivero



INIA La Estanzuela

Martín Fraga

Melissa Macias

Caroline Da Silva Silveiras

Federico Giannitti

Franklin Riet

Instituto de Higiene - UdelaR

Paulina Meny

Cristina Ríos

Natalia Ashfield

Jair Quinteros

Gustavo Varela

Felipe Schelotto

Instituto Pasteur de Montevideo

Leticia Zarantonelli

Cecilia Nieves

Camila Hamond

Otto Pristch

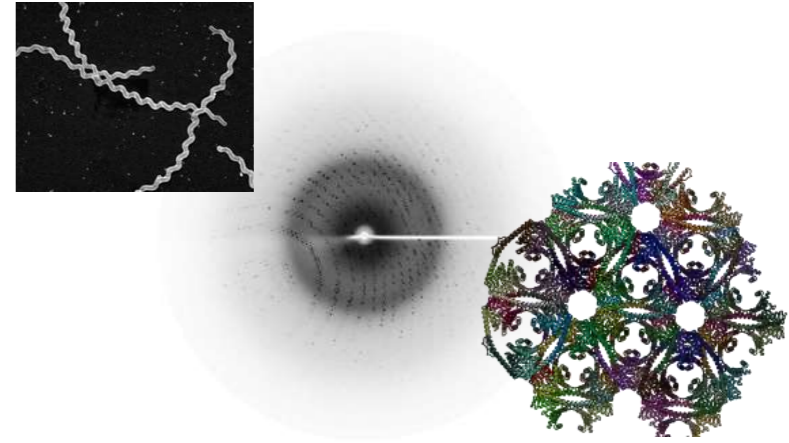
Luis Barbeito



otras agencias y colaboradores importantes :

- ANII (proyectos FSSA 2014-2017, Alianza 2015-2018)
- Lab industriales (Prondil, Virbac-Sta Elena, Microsules)
- Inst Pasteur, Francia (Centro Nacional de Ref Leptospirosis Francés, Centro Colaborador OMS)
- Fac de Veterinaria - UdelaR





Gracias!

Jornadas de Salud Animal

INIA La Estanzuela - nov 2019

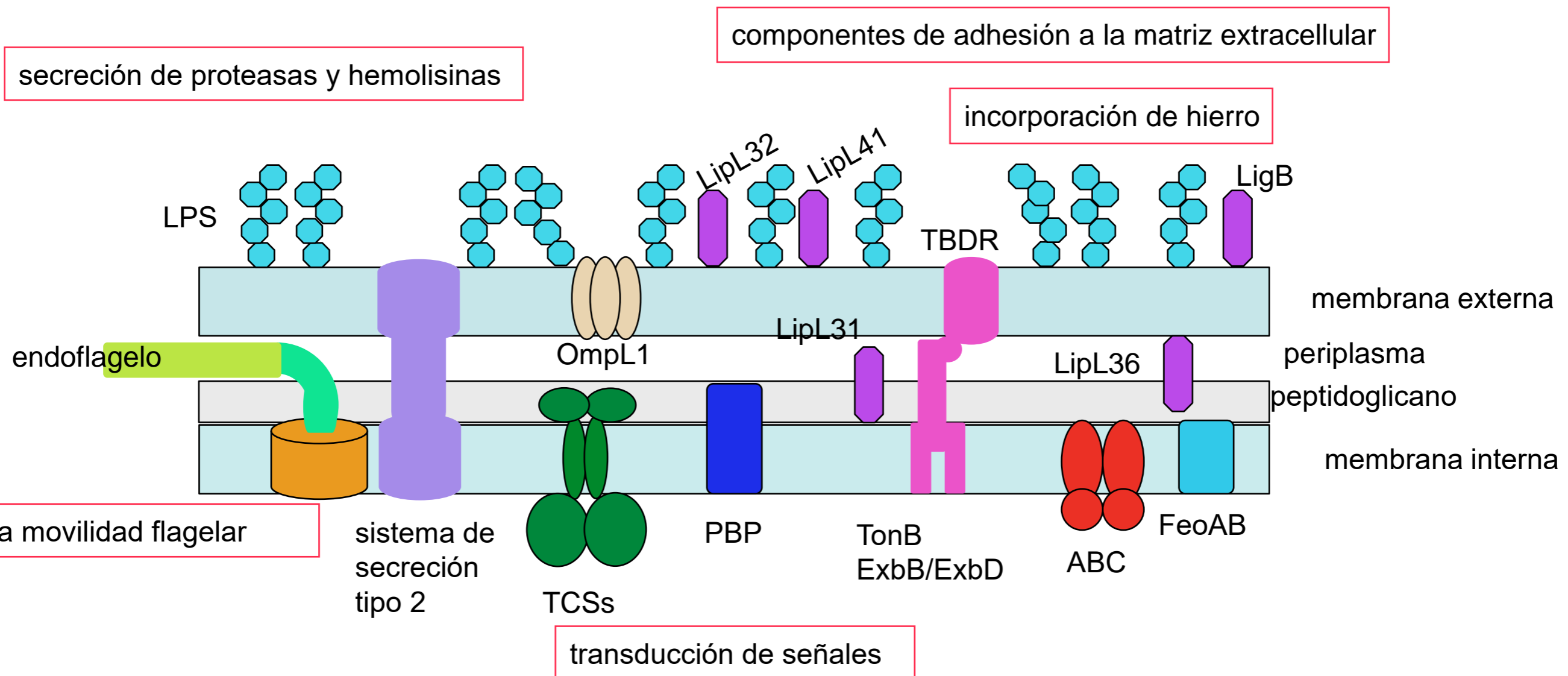
Resumen de causas de abortos de 431 fetos bovinos

Causas	Nº de fetos	Porcentaje
Infecciosas		
• Neospora		
○ confirmada	87	20
○ posible	19	4
• Virales		
○ confirmada	8	2
○ probable	6	1
• Leptospirosis		
○ confirmada	99	23
○ probable	24	6
• Campylobacteriosis	31	7
• Brucelosis	8	2
• Aborto bacteriano esporádico		
○ confirmada	8	2
○ probable	27	7
No infecciosas		
• Distocias	15	3
• Sin lesiones	99	23
TOTAL	431	

29%

La superficie de una célula de Leptospira

- endoflagelos (compuestos de muchas proteínas FlaAs, FlaBs etc etc)
- lipopolisacárido (LPS) → muy variable, determinante de la diversidad de serovares
- receptores TonB-dependientes (TBDR)
- ~ 145 lipoproteínas (varias específicas de spp patógenas: LipL32, LipL41, LigB, LipL36, etc)
- sistema de secreción de tipo II
- muchos sistemas de sensado (~70 to 110 genes de tipo TCS)



Hemos identificado dos sistemas de proteínas de leptospiras patógenas que modulan la virulencia con la que infectan (modelo agudo)

- **HemK/HemR** : un sistema tipo TCS que regula el metabolismo de hemo (notando que la enzima catabólica hemo-oxigenasa es un factor de virulencia)
- **LvrA/LvrB** : un sistema TCS atípico, sólo expresado en todas las spp patógenas de *Leptospira*, que regula virulencia y motilidad

