

# ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE AUTÓCTONA DE LEPTOSPIRA PARA SU POTENCIAL USO COMO ANTÍGENO EN VACUNAS DE USO VETERINARIO

Camila Ciuffo,<sup>1</sup> Ana Paula Arévalo<sup>2</sup>, Federico García<sup>1</sup>, Yisell Perdomo<sup>3</sup>, Martina Crispo<sup>2</sup>,

Federico Giannitti<sup>3</sup>, Alejandro Buschiazzo<sup>4</sup>, Leticia Zarantonelli<sup>1,4</sup>

1- Unidad Mixta Pasteur + INIA.

2- Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio.

3- Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

4- Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

## RESUMEN

En Uruguay, *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki es una de las variantes más frecuentemente aislada en bovinos. Las vacunas actualmente disponibles contra leptospirosis bovina no incluyen esta variante autóctona. En este trabajo evaluamos la capacidad infectiva e inmunogénica de la variante autóctona de *L. interrogans* Pomona Kennewicki aislada de bovinos, en un modelo murino de infección sub-letal y crónica utilizando una vía de infección natural. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad infectiva, de diseminación sanguínea, colonización del parénquima renal e inmunogenicidad de este aislamiento autóctono validando así su potencial uso como antígeno de interés a ser incluido en la formulación de vacunas anti-leptospira de uso veterinario en Uruguay y la región.

## SUMMARY

*Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki is one of the most frequently isolated variants in cattle in Uruguay. Currently available vaccine against bovine leptospirosis do not include this autochthonous strain. In this work we evaluated the infective and immunogenic capacity of the autochthonous variant of *L. interrogans* Pomona Kennewicki isolated from bovines, in a chronic sublethal murine model using a natural route of infection. The results demonstrate the infective capacity, blood dissemination, colonization of the renal parenchyma and immunogenicity of this autochthonous isolate, thus validating its potential use as an

antigen of interest to be included in the formulation of anti-leptospira vaccines for veterinary use in Uruguay and the region.

## INTRODUCCIÓN

En Uruguay recientemente se lograron los primeros aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. patógenas obtenidos de ganado bovino, pertenecientes a 3 especies diferentes: *L. interrogans* (sg. Pomona sv Kennewicki y sg. Canicola sv Canicola), *L. borgpetersenii* (sg. Sejroe sv Hardjo) y *L. noguchii* (sg. Australis, Autumnalis, Pyrogenes y no aglutinables con el panel de sueros de referencia), siendo *L. interrogans* Pomona Kennewicki la variante más frecuentemente aislada (Zarantonelli et al., 2018). Esta también fue identificada en brotes de leptospirosis en ovinos y jabalíes (*Sus scrofa*) (Hamond et al., 2019, Hamond et al., 2019) y en casos de leptospirosis humana, sugiriendo potencial transmisión zoonótica (Meny et al., 2017). Las vacunas para la prevención de leptospirosis están formuladas con bacterias enteras inactivadas de diferentes serovares de *Leptospira* spp. Para su efectividad, la OIE recomienda incluir los serovares (preferentemente los genotipos) circulantes en una determinada región. Las vacunas disponibles en Uruguay contienen con cepas que podrían ser antigénicamente distintas a las variantes de leptospira que infectan al ganado bovino, pudiendo comprometer su eficacia en la protección contra la enfermedad y/o la infección cuando los animales están expuestos a serovares circulantes. El objetivo de este estudio fue evaluar atributos de virulencia, patogenicidad e

inmunogenicidad de *Leptospira interrogans* sg Pomona sv Kennewicki, en un modelo murino mimetizando una vía de infección natural.

### MATERIALES Y MÉTODOS

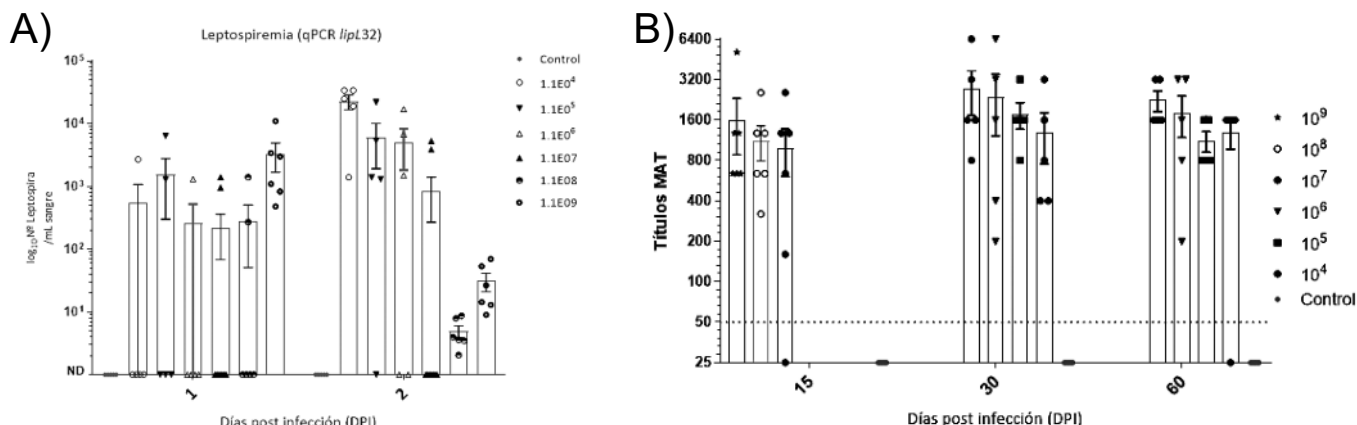
El aislamiento IP1710039 obtenido de un bovino de un establecimiento agropecuario con antecedentes de abortos fue utilizado para infectar por vía intranasal ratones hembra C57BL/6J de 8 semanas de edad. (Protocolo 003/20 aprobado por la CEUA del IPMon). Se inocularon dosis infectivas de  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  en grupos de n=5-6 animales, y tampón PBS en el grupo control. Se registró el peso de los animales diariamente. Para evaluar la capacidad infectiva, se determinó la leptospiremia (sangre) durante 7 días post infección (DPI), la leptospiruria (orina) y la colonización renal a los 15 y 60 DPI mediante amplificación del gen *lipL32* por qPCR. La presencia de leptospiras viables en riñón se confirmó mediante cultivo microbiológico en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). Se evaluaron cambios histológicos renales a los 15 y 60 DPI mediante estudio de secciones transversales de ambos riñones coloreadas con hematoxilina y eosina (incluyendo corteza y médula). La respuesta inmune humoral se estudió cuantificando títulos de anticuerpos aglutinantes anti-leptospira a los 15, 30 y 60 DPI mediante test de microaglutinación (MAT).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien hasta los 3 DPI hubo una disminu-

ción transitoria en el peso de los animales infectados con los inóculos más altos ( $10^9$  y  $10^8$  leptospiras), estos recuperaron luego una ganancia de peso similar a la del grupo control. Se observó una fase de leptospiremia transitoria a las 24 y 48 horas PI para todos los inóculos evaluados (Fig.1.A), confirmando la capacidad de *L. interrogans* Pomona Kennewicki de infectar través de la mucosa nasal. Evaluando la colonización renal, en un primer ensayo se observó leptospiruria a los 7 DPI para inóculos de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$ , con una mayor carga de leptospiras en orina a los 15 DPI en el grupo con el inóculo más bajo ( $10^7$ ). Luego, se evaluó la cronicidad de la infección desafiando con inóculos de  $10^7$  hasta  $10^4$  leptospiras, observando en todos los casos que la cantidad de leptospiras excretadas en orina fue en aumento hasta los 30 DPI, manteniéndose un nivel constante hasta los 60 DPI (Fig.2. A y B). Se cuantificó la carga de leptospiras en el riñón a los 15 y 60 DPI observándose en promedio una menor carga bacteriana en el grupo infectado con  $10^9$  leptospiras, de acuerdo con lo observado en los niveles de leptospiruria (Fig.3. A y B). La presencia de leptospiras viables en muestras de tejido renal se confirmó mediante cultivo y aislamiento bacteriológico. Se evidenciaron lesiones histológicas mínimas en el parénquima renal de algunos animales infectados (8/18) a los 15 DPI, mientras que a los 60 DPI se observaron lesiones mínimas a severas en 19 de 20 animales infectados, demostrando patogenicidad y colonización bacteriana en cronicidad. Por último, se evidenció la inmunogenicidad de *L. interrogans* Pomona Kennewicki

Figura 1. Detección de leptospiras en sangre a las 24 y 48 hs post-infección (A). Títulos de anticuerpos detectados por MAT (B)



en todos los inóculos ensayados, con cuantificación de títulos de anticuerpos entre 200 y 6.400 (Fig.1.B). Estos resultados demuestran la capacidad infectiva a través de la mucosa nasal, diseminación sanguínea, colonización del parénquima renal e inmunogenicidad de la variante autóctona de *L. interrogans* Pomona Kennewicki validando su potencial uso como antígeno de interés a ser incluido en la formulación de vacunas anti-leptospira de uso veterinario en Uruguay y la región. Además, la estandarización de un modelo murino de infección sub-lethal y crónica resulta de interés para evaluar nuevas formulaciones de vacunas dirigidas a controlar la infección y colonización renal por leptospira.

## BIBLIOGRAFÍA

Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, 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.

Hamond C, Silveira CS, Buroni F, Suanes A, et al. (2019) *Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki infection in two sheep flocks with acute leptospirosis in Uruguay. Transbound Emerg Dis.

Hamond, C., Nieves, C., Cabrera, A., Silveira, C.D., et al. (2019) *L. Wild boars (sus scrofa) are reservoirs of Leptospira interrogans in Uruguay. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.*

Meny P, Menéndez C, Quintero J, Hernández E, et al. (2017) Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.

Figura 2. Cinética de excreción de *L. interrogans* Pomona Kennewicki en orina a los 15 (A) y 60 (B) DPI

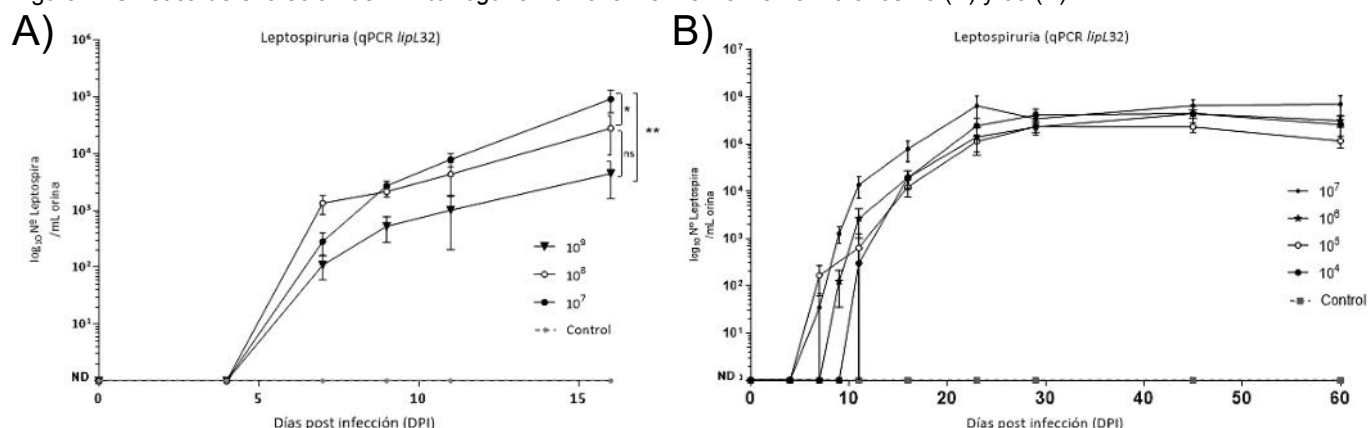


Figura 3. Detección de leptospirosis en tejido renal a los 15 DPI (A) y a los 60 DPI (B)

