



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Leptospira sp.* EN MUESTRAS DE RIÑÓN Y
SANGRE DEL MUSTÉLIDO *Neovison vison*

CAMILA NÚÑEZ ELGUEDA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: LISETTE LAPIERRE
Financiamiento: Proyecto FONDECYT N° 1100139

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Leptospira sp.* EN MUESTRAS DE RIÑÓN Y
 SANGRE DEL MUSTÉLIDO *Neovison vison*

CAMILA NÚÑEZ ELGUEDA

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Medicina Preventiva
 Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : LISETTE LAPIERRE
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SAENZ
PROFESOR CONSEJERO: LORETO MUÑOZ

SANTIAGO, CHILE
 2013

MEMORIA DE TITULO

“DETECCIÓN DE *Leptospira* sp. EN MUESTRAS DE RIÑÓN Y SANGRE DEL MUSTÉLIDO *Neovison vison*”

Camila Milenko Núñez Elgueda

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis re-emergente de distribución mundial, producida por bacterias patógenas del género *Leptospira*. El cuadro clínico en humanos varía desde asintomático hasta letal. La transmisión de la bacteria a un hospedadero susceptible se realiza por contacto directo o indirecto con orina de animales infectados. Dentro de la epidemiología los cursos de agua cumplen un rol significativo, ya que la bacteria es hidrofílica, permaneciendo viable en agua por largos períodos de tiempo. Los animales de vida silvestre son un importante reservorio, siendo los roedores el caso más estudiado, también se ha evidenciado transporte renal y largos periodos de leptospiuria, en mustélidos, zorrillos y mapaches. Al respecto estudios recientes en Francia han revelado 86% de prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira*, y un porte renal de un 23%, por pruebas de PCR, en visón americano (*Neovison vison*). Con el fin de detectar *Leptospiras* patógenas en visones americanos de vida libre, introducidos en el sur de Chile, se tomaron muestras de sangre y riñón desde animales capturados en 3 regiones distintas del país (Los Ríos, Los Lagos y Aysén). Se detectaron *Leptospiras* patógenas mediante PCR en 29 de 57 individuos. Las muestras de riñón presentaron mayores resultados positivos en proporción a la cantidad de muestras analizadas. Las regiones de los Lagos y de Aysén obtuvieron mayores tasas de captura y alto porcentaje de individuos positivos. *Neovison vison* presentó un alto porcentaje de portación de *Leptospira* (50%), pudiendo ser un importante agente diseminador de esta bacteria. Debido a su capacidad invasiva de ambientes naturales, y a la interacción con especies domésticas y silvestres nativas se deben realizar estudios que lo confirmen.

Palabras claves: *Leptospira* sp., zoonosis, mustélidos, *Neovison vison*.

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emerging zoonosis with a worldwide distribution, caused by pathogenic bacteria of genus *Leptospira*. The symptomatic chart in humans could be from asymptomatic until lethal. The bacterial transmission is by direct contact or indirect, with infected animal's urine contact. In this disease epidemiology the water courses have a significant role, because this is a hydrophilic bacterium, capable of stay viable in water for long periods of time. The wild animals are an important reservoir, being the rodents the most studied group; also there is evidence of renal transport and long periods of leptospiuria, in mustelids, skunks and raccoons. About this matter, recent studies in France have revealed 86% of prevail of *Leptospira* antibody and a renal carriage of 15-23% by PCR test in american mink (*Neovison vison*). In order to detect pathogen *Leptospira* in wild, American minks insert in southern Chile, blood and kidney samples have been taken from animals captured in 3 different regions of Chile: De Los Rios, De Los Lagos and De Aysen. Pathogens *Leptospira* were detected by PCR test 29 of 57 individuals. Kidney samples presented more positive results in proportion to the number of analyzed samples. The regions of De Los Lagos and De Aysen got bigger capture rate and higher percentage of positive individuals. *Neovison vison* presented a high percentage of *Leptospira* carriage (50%) and it could be an important agent in this bacteria spread. Because the invasive habits of this specie, and its capability to contact domestic and wild animals, it's necessary more research to confirm this conclusion.

Key words: *Leptospira* sp., zoonosis, mustelids, *Neovison vison*, american mink.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades zoonóticas constituyen una importante preocupación a nivel mundial. La relación que existe entre los agentes patógenos zoonóticos y los animales silvestres cobra relevancia, debido a que éstos pueden actuar como reservorios para algunos de estos agentes. Es el caso de la leptospirosis una enfermedad infecciosa que afecta a mamíferos domésticos y silvestres, incluido el hombre. Esta zoonosis es considerada un problema de salud pública en Asia y Latinoamérica, además actualmente se ha catalogado como una enfermedad re-emergente en poblaciones humanas. En Chile, existen datos de un incremento de la incidencia de casos de leptospirosis en humanos en los últimos años, no pudiendo establecerse con certeza la fuente de infección. Debido a esto, en nuestro país desde el año 2000 es una enfermedad de notificación obligatoria.

El agente infeccioso de la leptospirosis es una bacteria perteneciente al orden espiroquetas, familia Leptospiraceae, género *Leptospira*. Este género contiene un variado grupo de organismos, que han sido divididos genotípicamente en 17 genomo-especies. Según esta clasificación hay 3 grupos de *Leptospiras*: patógenas, oportunistas y saprofitas (Cerqueira y Picardeau, 2009). Las especies patógenas más importantes son: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* y *L. alexanderi* (Evangelista y Coburn, 2010). (Anexo1, Tabla 1). Antiguamente este género se dividía fenotípicamente en dos especies: *L. interrogans* que comprendía a las especies patógenas y *L. biflexa* al que pertenecían las especies saprofitas (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). También se utiliza la clasificación serológica según sus relaciones antigénicas, describiéndose más de 225 serovares patógenos (Moore *et al.*, 2006; Evangelista y Coburn, 2010).

La infección en el humano y otros hospederos susceptibles ocurre por contacto directo con orina de animales infectados, o indirectamente a través de agua, tierra o alimentos contaminados con *Leptospiras* patógenas (Sykes *et al.*, 2011). Al ingresar al organismo esta bacteria invade prácticamente todos los tejidos y órganos, produciendo diversas manifestaciones clínicas en el hospedero. Posteriormente es eliminada por el sistema inmune, no obstante lo cual, puede asentarse en los túbulos proximales de los riñones y ser excretada por la orina transformándose, el hospedero, en portador (Terpstra, 2003). Los síntomas pueden tener distintos grados de severidad, que van desde una infección de tipo gripal leve, hasta un síndrome multiorgánico que puede ser fatal, caracterizado por ictericia, hemorragia pulmonar,

disfunción hepática y/o renal y lesiones vasculares en distintos órganos, conocido como enfermedad de Wei (Plank y Dean, 2000).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza por serología, debido a las dificultades asociadas al aislamiento de la bacteria como son la alta complejidad de su cultivo y la baja sensibilidad de éste (45%) (Moore *et al.*, 2006). La prueba de referencia de la OMS, es la Microaglutinación (MAT), ésta presenta algunas dificultades como una sensibilidad variable, reacciones cruzadas entre serovares, y pacientes con ausencia o retardo en el incremento de anticuerpos (Brown y Prescott, 2008). Teniendo en cuenta estas limitaciones, se han desarrollado otras pruebas diagnósticas como es la detección del genoma bacteriano por métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Moreno y Agudelo-Flórez, 2010)

Respecto a la epidemiología, las bacterias del género *Leptospira* son consideradas ubicuas en términos de su distribución geográfica, estando presentes en casi todo el mundo. Estas bacterias pueden sobrevivir hasta 180 días en tierra y al ser hidrófilas, pueden permanecer viables por varios meses en reservorios naturales de agua como pantanos, lagunas, y estanques (Bharti *et al.*, 2003). La leptospirosis actualmente ha causado brotes epidémicos alrededor del mundo, algunos de los países registrados son Nicaragua, Brasil, India y Colombia (Moreno y Agudelo-Flórez, 2010). En EE.UU, Canadá y algunos países de Europa, han ocurrido brotes en personas que realizan actividad física en entornos naturales y acuáticos (Evangelista y Coburn, 2010). Además, se ha documentado un marcado aumento de leptospirosis en caninos domésticos en Canadá y EE.UU. Esta situación puede atribuirse a un incremento de la incidencia de esta enfermedad, por causas de tipo ecológico como son el calentamiento global o el incremento de contacto con animales silvestres, ya que los serotipos encontrados se asocian generalmente a poblaciones silvestres, como mapaches (Prescott, 2008). Los perros constituyen el principal reservorio dentro de los animales domésticos, aunque los serotipos presentes en ellos, han sido controlados gracias a la vacunación canina (Brown y Prescott, 2008).

El número de casos de leptospirosis en pacientes humanos que ocurren mundialmente no es conocido con precisión, debido a que los casos generalmente no son adecuadamente diagnosticados. Cuando se producen brotes, y en grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 casos por 100.000 personas. La tasa de letalidad varía entre un 5 a un 30% (Terpstra, 2003)

En Chile es una enfermedad endémica, pero no se conoce la real magnitud del problema debido a que esta enfermedad hasta hace pocos años no formaba parte de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (MINSAL, 2004). Esta situación cambió en el año 2000, cuando el Reglamento N° 712 sobre Notificación de Enfermedades de Declaración Obligatoria, establece que *Leptospira sp.*, será objeto de vigilancia. En el año 2004 el Decreto N° 158, incluyó a la Leptospirosis como una enfermedad de notificación obligatoria inmediata y pasa a ser objeto de Vigilancia de Laboratorio (MINSAL, 2004).

En nuestro país en el ámbito de la medicina veterinaria, se han realizado escasos estudios en relación con este patógeno. Al respecto Zamora y Riedemann ((a) 1999), encontraron una seroprevalencia del 18,4% en roedores en la Región de Los Ríos (Chile). Silva y Riedemann en el 2007, señalaron que la prevalencia detectada en perros atendidos en clínicas veterinarias de Valdivia, fue de un 18,2%.

El rol epidemiológico de los roedores en la mantención de la leptospirosis está bien documentado, pero es poco lo que se sabe acerca de otras especies de vida libre, ya que no existen datos en otras especies silvestres que puedan aportar antecedentes epidemiológicos de esta enfermedad. En este sentido un animal silvestre que puede ser importante epidemiológicamente es el visón americano (*Neovison vison*), un mamífero carnívoro de la familia *mustelidae*, que fue introducido a Chile en zonas rurales de Punta Arenas, Coihaique y Puerto Montt, con finalidades comerciales a partir del año 1934. Más tarde, a través de liberaciones voluntarias desde granjas peleteras, escapes accidentales y colonización de individuos desde Argentina las poblaciones silvestres de este animal en Chile comenzaron a asentarse y posteriormente a propagarse (González, 2007).

Estos mustélidos se han convertido en una de las especies invasoras más dañinas para la biodiversidad de nuestro país, especialmente en la Región de Aysén, entre los daños atribuidos se encuentra la fuerte depredación sobre huevos, crías y adultos de numerosas especies de aves acuáticas, roedores silvestres, peces, crustáceos, anfibios endémicos, y animales de granja (Medina, 2010).

Por esta razón el visón puede contagiarse con enfermedades infecciosas desde animales domésticos, ya que suele estar en contacto con asentamientos humanos y también desde animales silvestres, de esta forma amplía el espacio de propagación de patologías hacia los animales endémicos, de granja o de compañía y también al hombre, posee además

conductas acuáticas habitando en las cercanías a cuerpos de agua pudiendo contaminar estas fuentes (Medina, 2010).

Existen estudios que han reportado como reservorio a mustélidos, zorrillos y mapaches, aunque en estas especies no se han reportado signos clínicos de enfermedad, existe evidencia de transporte renal y de largos periodos de leptospiruria (Gaydos *et al.*, 2007). Una investigación realizada por Moinet *et al.* (2010) documentó en el sur-oeste de Francia la presencia de *Leptospiras* patógenas en las especies visón europeo (*Mustela luterola*) y visón americano (*Neovison vison*) por análisis de muestras de riñón y suero sanguíneo mediante MAT, registrando altos niveles de prevalencia de anticuerpos para 6 serogrupos de *Leptospira* patógenas, (86% en visón americano de vida libre; 65,4% en visón europeo y 31% en visones americanos de granja). Mediante PCR se detectó un porte renal de un 23% en 34 visones europeos y de un 15% en 33 visones americanos. El rol de estos carnívoros de vida libre debe ser considerado en la epidemiología de esta enfermedad, ya que todas las especies infectadas por *Leptospira* son potenciales excretores y por lo tanto hospederos amplificadores y diseminadores de la enfermedad (Adler y De La Peña Moctezuma, 2010).

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Leptospiras* patógenas en muestras de riñón y de sangre obtenidas desde visones americanos de vida libre, capturados en tres regiones del sur de Chile (de Los Ríos, de Los Lagos y de Aysén). Regiones donde el visón es considerado una especie invasora plaga, según el artículo 6º del Reglamento de la Ley de Caza (SAG CHILE). La información que se obtenga desde animales de vida libre es muy valiosa en la conservación del equilibrio ecológico, en medicina veterinaria preventiva y en salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio: El estudio se realizó en el sur de Chile, entre las latitudes 39ºS a 45ºS, en 6 áreas distintas, que comprendían territorios de la Región de los Ríos, Región de los Lagos y Región de Aysén (Anexo 2, Tabla 2). Todos los sectores de muestreo se encontraban cercanos a fuentes de agua, ya sea dulce o salada.

Muestras: Las muestras se obtuvieron desde 57 visones capturados por medio de jaulas-trampas distribuidas en un radio de 2-3 km dentro del área de muestreo. Los visones capturados fueron anestesiados con una combinación de ketamina y xilacina. Se extrajeron dos muestras de sangre desde yugular (una para tubo con buffer de lisis, y otro con EDTA) las

cuales fueron mantenidas a -20° C. Se registró: el lugar de muestreo, sexo, y peso. Los animales fueron sacrificados por punción intracardiaca con tiopental (0,5 ml/visión, concentración 5%), y se recolectó una muestra de riñón por laparotomía, la cual fue conservada a -20° C en alcohol 70%. Posteriormente las muestras se transportaron al Laboratorio BIOVETEC, FAVET para su procesamiento.

Purificación de ADN desde las muestras de sangre y riñón: Se extrajeron 500 µl de la muestra que se traspasaron a un tubo eppendorf de 1,7 ml, se agregó 900µl en muestra de riñón y 500 µl en el caso de sangre, de tampón de lisis de DNA (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA pH 8 y 400mM NaCl), más 100 µl SDS 10%(p/v) y 20 µl de proteinasa K 20 mg/ml). Se mezclaron en vortex y se incubó a 65°C por 60 min en baño seco (calentador *Standard Heatblock I 949040*). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C (centrífuga *Hermle Z300 K*). Del sobrenadante se traspasaron 500 µl a un nuevo tubo y se agregó 200µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50%:48%:5%), se mezclaron invirtiendo varias veces. Luego se centrifugó a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se agregó 0,1 volumen de NaAc y 1 volumen de isopropanol 100% y se mantuvo 24 horas a -80°C (freezer *Ishin Europe model DF8514*), para permitir la precipitación de ADN. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70%(v/v), a continuación el precipitado se secó en estufa a 37°C (incubadora *Memmert modell 100-800*) y se resuspendió en 250 µl de agua libre de nucleasas, el ADN eluido se almacenó a -80°C hasta realizar los PCR (Lester y Lefebvre, 2003).

Identificación de *Leptospira interrogans*, mediante PCR anidado en las muestras de sangre y riñón: se realizó un PCR anidado para detectar el ADN bacteriano de *leptospiras* patógenas en las muestras previamente purificadas. Se utilizaron 100 µg/ µl de ADN de cada muestra como templado. Los partidores usados en este protocolo corresponden a una comparación de secuencias del gen ribosomal 16S de *leptospiras* patogénicas conocidas: PF1 (5'-AGGGAAAAATAAGCAGCGATGTG-3') y PR1 (5'-ATTCCACTCCATGTCAAGCC-3') en el primer PCR. En el segundo se utilizó 1 µl del producto del primer PCR como ADN templado y los siguientes partidores: PF2 (5'-GAAACTGCGGGCTCAAAC-3') y PR2 (5'-GCTCCACCGCTTGTGC-3'). Además, se utilizaron para cada tubo en ambos PCR los siguientes reactivos: 200 µM de deoxinucleotidos trifosfatos, 2,5 µl de buffer 10X, 15 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq polimerasa. El volumen final se ajustó a 25 µl con agua libre de nucleasas (Lester y Lefebvre, 2003).

La amplificación se realizó en un termociclador (ESCO®) con el siguiente programa para ambos PCR: denaturación inicial (5 min a 94°C); 35 ciclos de amplificación (**30 seg a 94°C; 30 seg a 57°C** (primer PCR) **y 52°C** (segundo PCR); **30 seg a 72°C**); elongación final (5 min a 72°C).

Para observar los productos de la reacción de amplificación se realizó un gel de agarosa al 1%, el cual se corrió a 100V (volt) durante 60 minutos, usando buffer TAE 1X y marcador de peso molecular de 100 y 1000 pares de bases. La tinción del gel se realizó con red gel y luego los resultados se visualizaron bajo una fuente de luz Ultra Violeta (U.V.).

El tamaño del primer amplificado fue 571 pb y del segundo amplificado 370 pb (Wangroongsarb *et al.*, 2007). Se utilizó como cepa control positiva el ADN de una vacuna canina purificada que contiene *Leptospira Interrogans Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* inactivada.

Secuenciación de las muestras positivas a *Leptospira interrogans*: Con el objetivo de determinar el genotipo de *leptospira* a aquellas muestras que amplificaron en el PCR anidado para leptospirosis patógenas se les realizó otro PCR, también amplificando el gen 16s ARN ribosomal, los primers utilizados fueron 5'-AGGGAAAATAAGCAGCGA-3' y 5'-ATTCCAATCCATGTCA-3', Los ciclos correspondieron a denaturación a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 min, y elongación a 72°C por 1 minuto, repetido por 30 ciclos. (Wangroongsarb *et al.*, 2007). En este caso el producto es de un tamaño entre 1000 a 1500 pb, que cumple con el mínimo necesario según Lester y Lefebvre. Los productos resultantes de este PCR fueron enviados a secuenciar a Genytec. Las secuencias obtenidas fueron ingresadas al programa en línea de búsqueda de alineamiento BLAST, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

RESULTADOS

Se capturaron 57 individuos, 38 de ellos correspondieron a machos (67%) y 19 a hembras (33%) (Figura 1). Se lograron capturar 34 individuos en la región de Aysén, 15 en la Región de Los Lagos y 8 en la Región de Los Ríos (Figura 2).

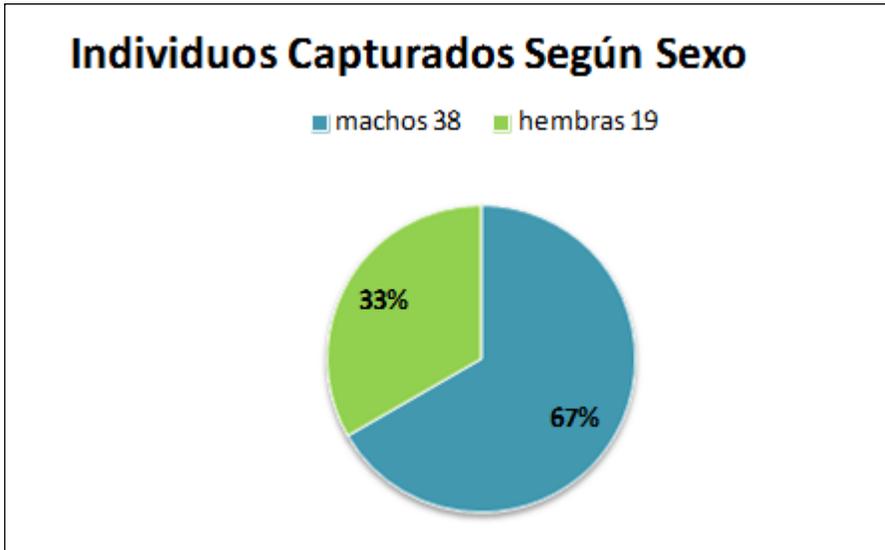


Figura 1. Visones capturados. Porcentajes según sexo (n = 57).

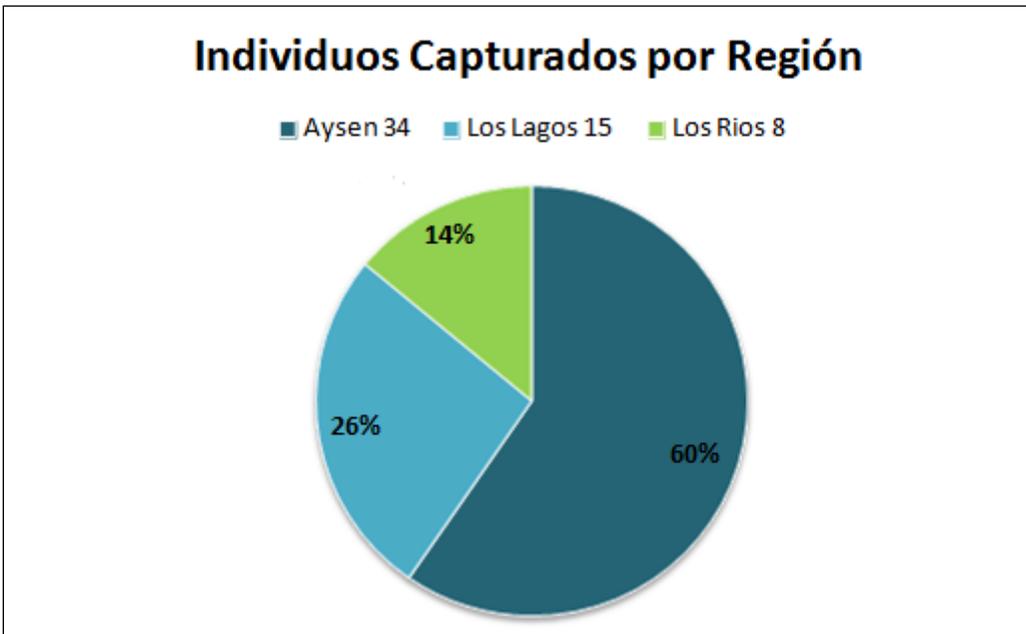


Figura 2. Porcentaje de visones capturados clasificados por región.

Se consideró como diagnóstico positivo, a aquel individuo que presentó alguna de las 3 muestras (sangre en buffer de lisis, sangre con EDTA, y/o riñón en alcohol) como positivas a la técnica de PCR. Del total de individuos, 29 fueron positivos (50%), de los cuales 18 correspondieron a machos (estos equivalen al 62% de los positivos y al 47% de machos capturados) y 11 hembras (38% de los positivos, que corresponden al 57% de las hembras capturadas) (Figuras 3).

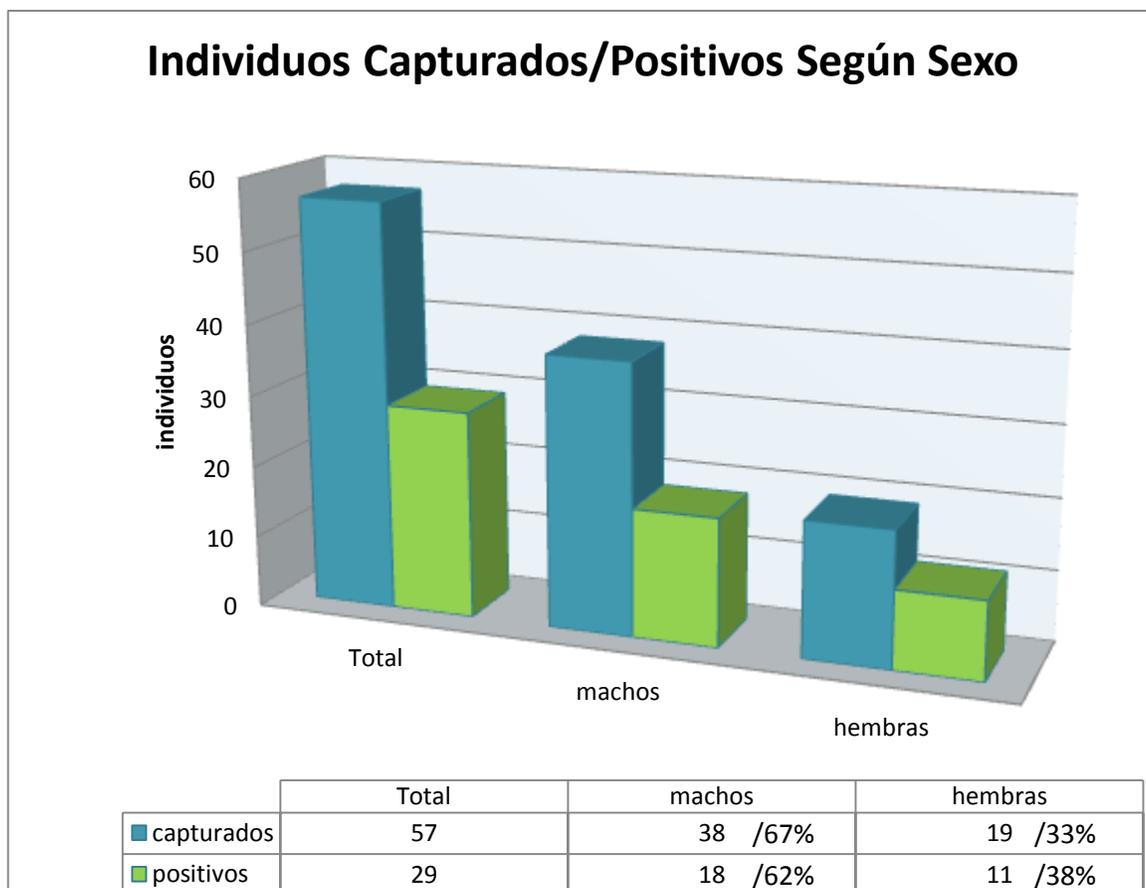


Figura 3. Individuos capturados *versus* individuos positivos. Se muestra la proporción de positivos totales y la proporción de positivos clasificados según sexo.

Se obtuvo un total de 30 muestras de riñón, de las cuales resultaron 13 positivas (43%), 48 muestras de sangre con EDTA, de las cuales 9 fueron positivas (19%), y 50 muestras de sangre en buffer de lisis, de las cuales resultaron 18 positivas (36%) (Figura 5).

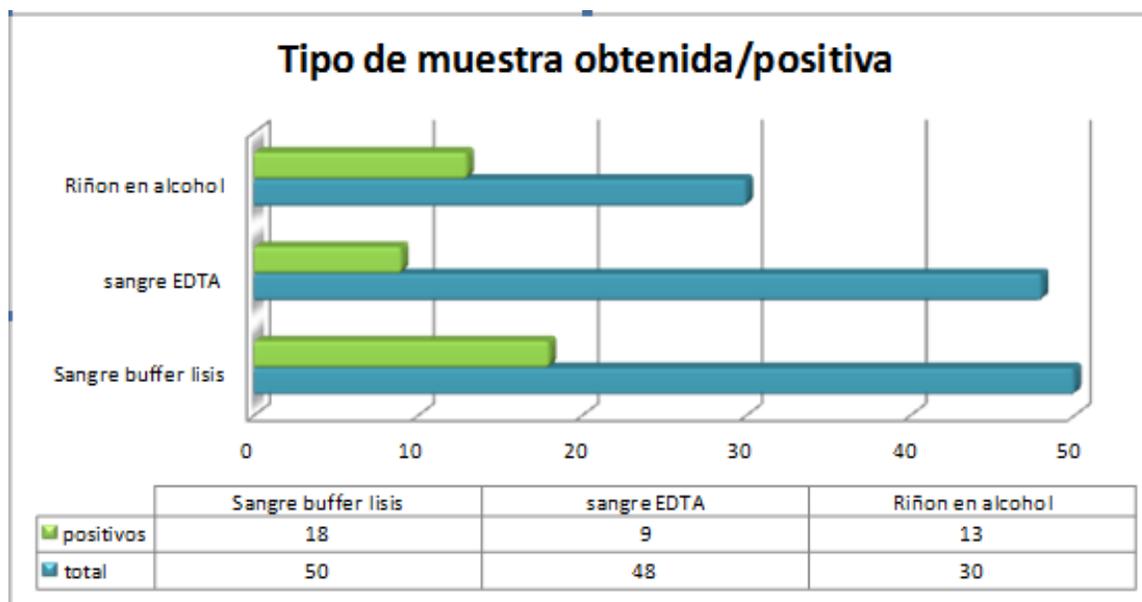


Figura 4. Porcentaje de muestras positivas según tipo de muestras analizadas.

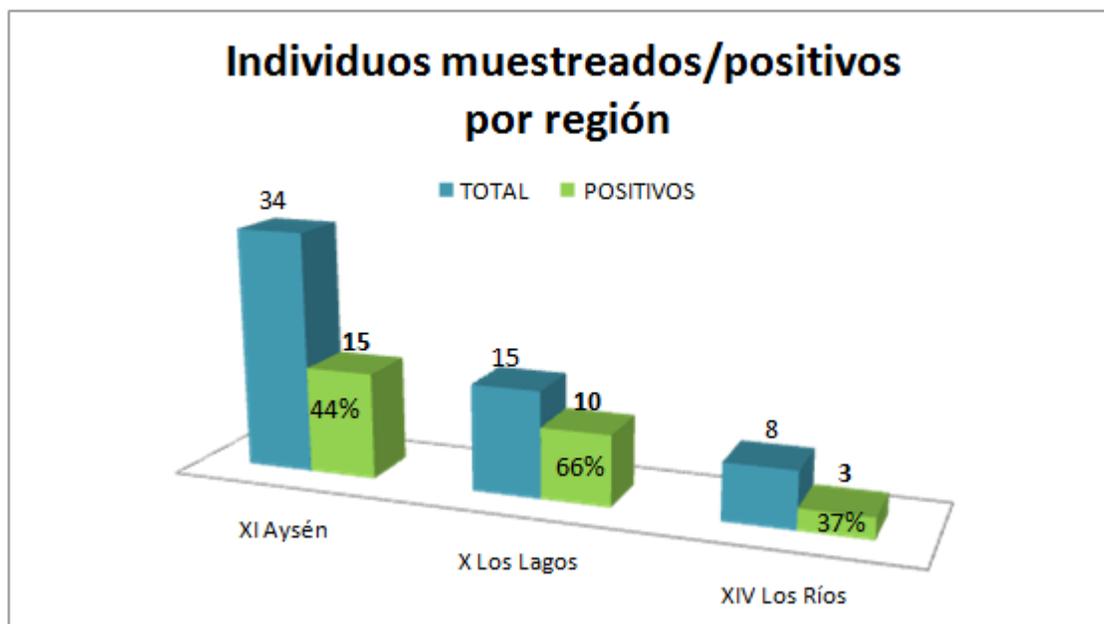


Figura N° 5. Cantidad de individuos muestreados por región *versus* positivos.

Respecto a los individuos positivos por región en la región de Aysén de 34 animales muestreados, 15 fueron positivos (44%), en la región de Los Lagos, de 15 individuos capturados 10 fueron positivos (66%) y en la región de los Ríos de 8 animales capturados 3 resultaron positivos (37%) (Figura 6). En la tabla n° 1 se detalla los animales capturados/positivos, en cada sitio de captura.

Tabla 1. Total de muestras analizadas y número de muestras positivas en cada uno de los sitios de captura de Neovison vison.

Procedencia	N° de muestras	N° de muestras positivas
Isla Magdalena (XI)	15	8
Río Cisnes (XI)	10	4
Puerto Cisnes (XI)	6	2
Liquiñe (XI)	3	1
Mauillin (X)	6	5
Lago Todos los Santos (X)	8	4
Palena (X)	1	1
Choshuenco (XIV)	3	0
Neltume (XIV)	5	3
Total	57	29

Con respecto a la secuenciación, el producto de PCR para este fin arrojó bandas inespecíficas, por lo que se envió a secuenciar a la empresa Genytec un total de 4 fragmentos de alrededor de 400pb. El resultado de las secuenciaciones al ser ingresado en el programa internacional en línea BLAST, alineo entre 96 y 97 % con *Leptospira Interrogans Serovar Lai*, *Leptospira Borgpetersenii Serovar Hardjo Bovis*, *Leptospira Interrogans Serovar Copenhageni*, todas clasificadas como *Leptospiras* patógenas (NC 004342.2, NC 008508.1, NC 005823.1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio registró un porcentaje de individuos positivos a *Leptospira* de un 50%, siendo la primera vez que se detecta este agente patógeno en mustélidos en Chile. Dentro de los tipos de muestra, sangre con EDTA, con buffer de lisis, y riñón en alcohol, el mayor número de positividad fue renal, esto era de esperar, ya que en los túbulo proximales se establece esta bacteria, para ser excretada por la orina, encontrándose en sangre sólo durante la infección inicial, el cuadro clínico, o periodos de reactivación.

El porcentaje de portación renal según PCR correspondió a un 43%, el cual es mayor a lo descrito en otras investigaciones que señalan una positividad en visones a *Leptospira* según porte renal de alrededor del 20% (Moinet *et al.*, 2010). Esto puede deberse a que todos los sitios de muestreo correspondieron a sectores cercanos a cuerpos de agua, ya sea dulce o salada, y también a que las regiones donde se realizaron, presentan una pluviosidad mayor a la de otras regiones del mundo, donde se efectuaron estudios similares, estos dos factores como se explicó anteriormente son claves en la sobrevivencia de la bacteria, que posee características hidrofílicas, sobreviviendo por meses en agua, y hasta 180 días en tierra (McDonough, 2001). Al respecto, cobra también relevancia la capacidad del suelo de retener agua, y el pH de este, ya que este patógeno tiene un óptimo de crecimiento a pH tendientes a la alcalinidad, entre 6.2 y 8.0 (Guerra, 2009), por lo cual sería interesante evaluar las condiciones de acidez/alcalinidad de los suelos en los sectores muestreados. Dentro de este marco, puede influir en el porcentaje de positividad, las estaciones climáticas en que fueron tomadas las muestras, ya que en su mayoría fueron extraídas en primavera y verano, y aunque algunos autores señalan que la persistencia de la bacteria en ambientes y reservorios es estacional, aumentando en invierno para disminuir en verano, teniendo una leve alza en primavera y otoño, otros aseguran que ya que sus óptimos de crecimiento son temperaturas altas, podría asociarse a épocas más cálidas, pero con alta humedad, probablemente esta serie de factores ambientales varían en cada región y específicamente en cada sector particular, influyendo de diversas maneras sobre la eco-epidemiología de este agente infeccioso y sus serovares (Zamora y Riedmann (b), 1999).

Otra importante razón de la alta positividad tiene relación con el tamaño muestral, ya que a pesar del reducido número de individuos muestreados (57), los escasos estudios registrados en mustélidos silvestres bordean la veintena de individuos capturados lo que disminuye la probabilidad de detectar certeramente los niveles de infección poblacionales. Otro factor importante puede deberse, a que como se mencionó anteriormente todos los sitios de muestreo

corresponden a sectores cercanos a cuerpos de agua, ya que estos aumentaban la probabilidad de capturar mustélidos debido a sus hábitos de vida. Por otra parte, el visón es un animal que ha presentado un marcado aumento en sus poblaciones, extendiéndose ampliamente en las regiones muestreadas, e incluso según datos recientes, no confirmados, algunos agricultores han visto este animal en la región de la Araucanía. Durante este proyecto se capturaron una gran cantidad de visones, aunque no todos fueron utilizados para este estudio. Se registraron mayores capturas en la Región de Aysén, esto puede deberse a que en esta región se establecieron las granjas peleteras de mayor tamaño, o bien fue donde los visones liberados se aclimataron en mejor medida. En la región de Los Lagos, a pesar del menor número de capturas, se detectó una gran proporción de individuos positivos a *leptospira*, aunque este tamaño muestral es muy pequeño para establecer conclusiones, puede ser un indicador, de que si bien el visón se adapta más en Aysén, las *leptospiras* patógenas se desarrollan mejor o resisten mayor tiempo en las condiciones climáticas de la región de Los Lagos, pero se necesitan mayores estudios para esclarecer estas interrogantes.

El índice de captura de individuos machos fue mayor al de hembras, probablemente esto se deba a que los primeros presentan un ámbito de hogar más amplio, asociado a conductas más excursivas, asociadas a territorialidad y busca de pareja, en comparación con los individuos hembras. Esta especie presenta una marcada conducta acuática, condición que lo predispone, por un lado a infectarse de leptospirosis desde aguas contaminadas, y a la vez a diseminar la bacteria hacia los cuerpos de agua. Las formas de contagio en animales y humanos son a través de las mucosas o piel erosionada, la cual entra en contacto con orina, agua o tierra contaminada con la bacteria. Por esta razón, el riesgo aumenta al realizar actividades al aire libre en lugares contaminados, principalmente deportes acuáticos como kayaking, rafting y otros, además de la falta de control sobre animales silvestres en asentamientos humanos (Brown y Prescott, 2008).

Como se indicó anteriormente, el visón es un fuerte depredador, principalmente de roedores, tanto introducidos como endémicos. Esto cobra relevancia ya que existen estudios que han detectado inoculación de la bacteria a través de mordidas y de ingestión de tejidos infectados, además del contagio por contacto directo o indirecto con orina infectada (Sykes *et al*, 2011). Esta situación amplía las formas de contagio de *Leptospira*, en especial hacia el visón desde sus presas. Dos de los serovares encontrados, *Lai* y *Copenhageni*, pertenecen al serogrupo *Icterohemorragiae*, de *Leptospira Interrogans*, que corresponde al grupo mayormente distribuido en roedores, datos importantes que podrían confirmar esta hipótesis.

La única especie silvestre no roedora en la cual ha sido detectada leptospira en nuestro país es en zorro culpeo (*D.culpoeus*) y zorro chilla (*D.griseus*), sospechándose también el contagio desde roedores, ya que constituyen una importante parte de su dieta (Zamora y Riedmann (b), 1999).

Otro de los serovares encontrados fue *Harjo Bovis*, que se clasifican dentro de *Leptospira Borgerpeterseni*, este serovar tiene principal asociación con el bovino, y ha sido detectado en los ganados vacunos de nuestro país (Riedmann y Zamora, 1987). Esto se puede deber, a que el sujeto de estudio se encuentra muchas veces cercano a asentamientos humanos, principalmente de zonas rurales, como granjas, con el propósito de depredar presas de fácil captura, como aves domésticas y crías de corderos, pudiendo infectarse en estas instancias desde bovinos no vacunados. Esta hipótesis cobra relevancia, ya que estudios recientes demuestran una corta sobrevivencia de *L. Borgerpeterseni* en el medio ambiente, debido a la pérdida de genes de resistencia, con una reducción de alrededor de 700 pares de bases en comparación con *L. Interrogans*, aunque sin ver afectado sus factores de virulencia, volviéndose probablemente de una bacteria de comportamiento generalista a uno especialista, en la cual prima el contagio directo por orina (Bulach *et al.*, 2006).

Podemos concluir con estos datos que el visón puede infectarse con leptospiras patógenas, y ser un potencial diseminador de esta bacteria. Sin embargo, se necesitan mayores estudios anatomopatológicos, diagnóstico *in vivo*, y análisis serológicos, que confirmen si estos animales desarrollan la enfermedad, y de ser hospedaderos de mantención, evaluar por cuánto tiempo pueden excretar la bacteria a través de la orina representando un riesgo en salud pública, y afectando además la biodiversidad de nuestra fauna nativa al ser un probable foco de diseminación de esta y otras enfermedades presentes en animales domésticos hacia la fauna silvestre y viceversa, siendo un factor tan importante como la depredación. Por estas razones es fundamental que los distintos organismos involucrados en salud y protección ambiental tomen medidas de control sobre este animal.

Conjuntamente se requieren investigaciones más extensas sobre la eco-epidemiología de las Leptospiras en nuestro país, ya que como se ha explicado es compleja, dependiendo de diversos factores de cada bacteria, de cada especie hospedero, además de particularidades individuales y numerosos elementos ambientales. Esto es de relevancia, ya que la leptospirosis humana es una enfermedad que en los últimos años ha registrado un aumento de casos en Chile, y en el mundo, considerándose una enfermedad re-emergente. Particularmente en

nuestro país es subdiagnosticada, ya que la prevalencia es baja comparada con países tropicales, y a que sus síntomas son muy similares a otras enfermedades, no considerando dentro de la anamnesis, otros factores de importancia como la actividad laboral del paciente, ya que todas aquellas labores en contacto directo con animales silvestres o domésticos, como ganaderos, agricultores, ordeñadores, veterinarios y operarios de matadero, tienen un riesgo mucho mayor de contagio, como también aquellos individuos con hábitos deportivos, especialmente en entornos acuáticos. Además, cabe mencionar que en los casos reportados en Chile, generalmente no se conoce con certeza la fuente de infección. Por todo lo anterior es de gran importancia mejorar las técnicas diagnósticas, tener vigilancia frente al aumento de casos, y promover la recaudación de mayor información con respecto a los portadores, diseminadores y cambios en la epidemiología de esta compleja bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- **ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A.** 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140:287-296.
- **BHARTI, A.; NALLY, J; RICARDI, J; MATHIAS, M; LOVETT, M; LEVETT, P; GILMAN, R; WILLING, M.; GOTUZZO, E; VINETZ, J.** 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 3: 757-772.
- **BROWN, K.; PRESCOTT, J.** 2008. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *CMAJ.* 178: 399-401.
- **BULACH, D. ; ZUERNER, R.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; ROOD, J.; DAVIES, J.; ADLER, B.** 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *PNAS* 103 (39): 14560-14565
- **CERQUEIRA, G.;PICARDEAU, M.** 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 9: 760-768.
- **CÉSPEDES, M.** 2005. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* 22: 290-307
- **EVANGELISTA, K.; COBURN, J.** 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5:1413-1425.
- **GAYDOS, J.; CONRAD, P.; GILARDI, K.; BLUNDEL, G.; BEN-DAVID, M.** 2007. Does human proximity affect antibody prevalence in marine-foraging river otters (*Lontra canadensis*)?. *J Wildl Dis.* 43: 116-123
- **GONZALES, C. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. ESPECIES INVASORAS DE CHILE.** 2007. Vison, información básica de especies invasoras presentes Chile. [en línea] <http://invasoresenchile.blogspot.com/2007_12_01archive.html> consulta: Agosto 2011.
- **GUERRA, M.** 2009. Leptospirosis. *Jam Vet Med Assoc.* 234: 472-478.
- **LESTER, J.; LEFEBVRE, R.** 2003. Detection of *Leptospira interrogans*. *Methods Mol Biol.* 216: 193-200.
- **McDONOUGH, P.** 2001. Leptospirosis in dogs- current status. Recent advances in canine infectious. International veterinary information service. [en línea] <http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/mcdonough/ivis.pdf> consulta: Enero 2013.
- **MEDINA, G. UNIVERSIDAD ANDRES BELLO. VITRINA AMBIENTAL.** 2010. Huillín versus visón. Proyecto Doctor Gonzalo Medina. [en línea] <<http://ambiental.unab.cl/etiqueta/neo-vison/>> consulta: Agosto 2011.
- **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL), CHILE.** 2004. Decreto Supremo N° 158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 22 de octubre 2004.

- **MOINET, M.; FOURNIER-CHAMBRILLON, C.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; AULAGNIER, S.; MESPLÈDE, A.; BLANCHARD, B.; DESCARSIN, V.; DUMAS, P.; DUMAS, Y.; COIĆ, C.; COUZI, L.; FOURNIER, P.** 2010. Leptospirosis in free-ranging endangered european mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, viverridae) from southwestern France. *J Wildl Dis.* 46:1141-1151.
- **MOORE, G.; GUPTILL, L.; GLICKMAN, N.; CALDANARO, R.; AUCOIN, D.; GLICKMAN, L.** 2006. Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. *Emerging infectious diseases.* 12:501-503.
- **MORENO, N.; AGUDELO- FLÓREZ, P.** 2010. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y multiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira spp.* en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 27:548-556.
- **PLANK, R.; DEAN, D.** 2000. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes Infect.* 2:1265–1276.
- **RIEDMANN, S.; ZAMORA, J.** 1987. Leptospirosis animal, serogrupos y serovares presentes en Chile y su importancia. *Arch. Med. Vet.* 19: 123-133.
- **PRESCOTT, J.** 2008. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *CMAJ.* 178: 397-398.
- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG), CHILE.** 2012. Reglamento de la ley de caza, Decreto supremo n° 5, Artículo 6°.
- **SILVA, R.; RIEDMANN, S.** 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. Med. Vet.* 39:269-274
- **SYKES, J.; HARTMANN, K; LUN, K; MOORE, G; STODDARD,R; GOLDSTEIN, R.** 2011. ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. *J Vet Intern Med.* 25: 1-13
- **TERPSTRA, W.** 2003. Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta. International Leptospirosis Society. World Health Organization.
- **WANGROONGSAB, P.; TEERAUT, C.; GUNLABUN, K.; LONG, D.; SATHEANMETHAKUL, P.; JETANADEE, S.; THAI PADUNGPANIT, J.; WUTHIEKANUN, V.; PEACOCK, S.; BLACKSELL, S.; SMYTHE, L.; BULANCH, D.; KALAMBAHETI, T.** 2007. Molecular typing of *Leptospira spp.* based on putative O-antigen Polymerase gene (wzy), the beneçt over 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiol Let.* 271: 170–179.
- **ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S. (a)** 1999. Aislamiento y sobrevivencia de Leptospiras en tejido renal de roedores silvestres. *Arch. Med. Vet.* 31(1). [en línea]. <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030132X1999000100011&Ing=es&nrm=i so>. consulta Agosto 2011

- ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S. (b) 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. Arch. Med. Vet 31(2): 127-151.

ANEXOS

Tabla 1. Clasificación de *Leptospira sp.* (Céspedes, 2005).

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
<i>Leptospiras patógenas</i>			
<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	Australis	Ballico
	<i>Australis</i>	Bratislava	Jez Bratislava
	<i>Bataviae</i>	Bataviae	Van Tienen
	<i>Canicola</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni	M 20
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Lai	Lai
	<i>Pomona</i>	Pomona	Pomona
<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes	Salinem	
<i>Sejroe</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	
<i>L. alexanderi</i>	<i>Manhao</i>	Manhao3	L 60
<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>	Hurstbridge	BUT 6
<i>L. inadai</i>	<i>Lyme</i>	Lyme	10
<i>L. kirschneri</i> *	<i>Autumnalis</i>	Bim	1051
	<i>Cynopteri</i>	Cynopteri	3522 C
	<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa	Moskva V
	<i>Pomona</i>	Mozdok	5621
<i>L. meyeri</i>	<i>Semarang</i>	Semarang	Velrad Semarang 173
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	Ballum	Mus 127
	<i>Ballum</i>	Castellonis	Castellon 3
	<i>Javanica</i>	Javanica	Veldrat Bat 46
	<i>Sejroe</i>	Sejroe	M 84
	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Perepicilin
<i>L. weillii</i>	<i>Celledoni</i>	Celledoni	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	<i>Autumnalis</i>	Fortbragg	Fort Bragg
	<i>Panama</i>	Panama	CZ 214 K
<i>L. santarosai</i>	<i>Bataviae</i>	Brasiliensis	An 776
	<i>Mini</i>	Georgia	LT 117
Genomospecies 1	<i>Ranarum</i>	Pingchang	80- 412
Genomospecies 4	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Hualin	LT 11 -33
Genomospecies 5	<i>Semarang</i>	Saopaulo	Sao Paulo
<i>Leptospiras saprófitas</i>			
Genomospecies 3	<i>Holland</i>	Holland	Waz Holland (P438)
<i>L. biflexa</i>	<i>Semarang</i>	Patoc	Patoc I
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	Codice	CDC

Tabla N 2: Sitios de captura y tipo de agua presente.

Region	Sitio	Tipo de Agua
De Los Rios (XIV)	Neltume	Lago
De Los Rios (XIV)	Choshuenco	Lago/ río
De Los Lagos (X)	Mauillin	Río/ mar
De Los Lagos (X)	Lago Todos Los Santos	Lago
De Los Lagos (X)	Palena	Río
De Aysen (XI)	Isla Magdalena	Mar
De Aysen (XI)	Rio Cisnes	Río
De Aysen (XI)	Puerto Cisnes	Mar
De Aysen (XI)	Liquiñe	Río