

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE UN KIT DE ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE
LEPTOSPIROSIS BOVINA**

por

AVILA AGUIRRE, Silvia Gimena

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Tecnología de los Alimentos

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Dr. Álvaro NÚÑEZ

Segundo Miembro (tutor):

Dr. José PIAGGIO

Tercer Miembro:

Dr. Kevin YANESELLI

Cuarto Miembro (Co –tutor):

Dra. Alejandra SUANES

Fecha:

27/09/2019

Autor:

Silvia Gimena ÁVILA AGUIRRE

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Alejandra Suanes y Dr. José Piaggio por darme la oportunidad de realizar este trabajo, enseñarme y guiarme en la elaboración del mismo.
- A DILAVE-MGAP, especialmente a la Dra. Ximena Salaberry por sus palabras y apoyo.
- A la Dra. Valentina Macchi por su ayuda y colaboración.
- A el Sr. Alberto Mortola por su colaboración y transmisión de conocimientos.
- A familiares y amigos por todo el apoyo brindado durante toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
2 RESUMEN.....	6
3 SUMMARY.....	7
4 INTRODUCCIÓN.....	8
5 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
5.1 Agente.....	9
5.2 Epidemiología de la enfermedad.....	10
5.3 Prevalencia.....	11
5.4 Estudios Nacionales.....	12
5.5 Patogenia.....	13
5.6 Signos Clínicos.....	14
5.7 Patología.....	15
5.8 Pruebas Diagnósticas.....	15
5.9 Métodos Directos.....	16
5.9.1 Aislamiento.....	16
5.9.2 PCR.....	17
5.10 Métodos Indirectos.....	18
5.10.1 MAT.....	18
5.10.2 ELISA.....	19
5.10.3 ELISA vs MAT.....	20
6 OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo General.....	23
6.2 Objetivos Específicos.....	23
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1 Selección de Muestras.....	24
7.2 MAT.....	24
7.3 ELISA.....	25
7.4 Análisis de datos.....	25
8 RESULTADOS.....	26
8.1 Sensibilidad y Especificidad relativas.....	26
8.2 CURVA ROC.....	28
8.3 Índice Kappa de Cohen.....	29
9 DISCUSIÓN.....	30
10 CONCLUSIONES.....	33
11 BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla I. Especies descritas del genero <i>Leptospira spp.</i> (Picardeu,2013).	9
Tabla II. Serovares utilizados para detección de anticuerpos por medio del MAT en el laboratorio DILAVE-DGSG-MGAP.	24
Tabla III. Desempeño del ELISA usando como referencia al MAT criterio de clasificación: sueros reactivos a cualquiera de los serovares utilizados en el panel.	26
Tabla IV. Resultado de Sensibilidad y Especificidad del ELISA relativas al MAT utilizando sueros reactivos a cualquiera de los serovares en el panel.	26
Tabla V. Desempeño del ELISA usando como referencia sueros reactivos a serovar Hardjo en el MAT.....	27
Tabla VI. Resultado Sensibilidad y Especificidad del ELISA relativas al MAT utilizando sueros reactivos a serovar Hardjo en el MAT.....	27
Tabla VII. Valor del área bajo la curva ROC.....	28
Tabla VIII. Sensibilidad y Especificidad según diferentes puntos de corte	29
Tabla IX. Valor de Índice Kappa de Cohen.	29
Tabla X. Clasificación de Galton.....	30
Figura 1. Ciclo epidemiológico de la Leptospirosis. Transmisión puede ser directa o indirecta.....	11
Figura 2. Pruebas diagnósticas serológicas y de detección del microorganismo, según etapa de infección Alder (2015) adaptado por Dr. Fernando Goday 2018.	16
Figura 3. Gráfica de la curva ROC obtenida del análisis de los resultados de ELISA de todos los sueros estudiados. Se representa sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X).	28

2. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de un kit de ELISA indirecto como alternativa al diagnóstico de leptospirosis bovina en Uruguay. Dicho kit detecta anticuerpos *Leptospira interrogans* serogrupo Sejroe serovar Hardjo. Se contó con un marco de muestreo de 113 sueros de bovinos hembras (vacas y vaquillonas) provenientes de establecimientos ganaderos con antecedentes de problemas reproductivos y sin antecedentes de vacunación contra Leptospirosis. Los sueros extraídos se procesaron en el laboratorio mediante la técnica MAT y ELISA indirecto. Se obtuvo un valor de sensibilidad y especificidad de 0,99% y 0,88% respectivamente. El análisis de la curva ROC de los resultados del ELISA relativos al MAT dio un valor para el área bajo esta curva de 0,90 teniendo el ELISA una capacidad discriminadora diagnóstica buena. El índice Kappa de Cohen fue de 0,89. Resultando el acuerdo entre ambas pruebas casi perfecto. La prueba ELISA indirecto es una alternativa ventajosa respecto al MAT para el diagnóstico de leptospirosis en el ganado bovino.

3. SUMMARY

The objective of this work was the evaluation of an indirect ELISA kit as an alternative to the diagnosis of bovine leptospirosis in Uruguay. This kit detects antibodies *Leptospira interrogans* serogroup Sejroe serovar Hardjo. There was a sampling frame of 113 sera of female cattle (cows and heifers) from livestock establishments with a history of reproductive problems and no history of vaccination against Leptospirosis. The extracted sera were processed in the laboratory by the indirect MAT and ELISA technique. A sensitivity and specificity value of 0.99% and 0.88% respectively was obtained. The analysis of the ROC curve of the ELISA results gave a value for the area under this curve of 0.90 with the ELISA having a good diagnostic discriminatory capacity. The Kappa value was 0.89. The agreement between both tests is almost perfect. The indirect ELISA test is an advantageous alternative to MAT for diagnosing leptospirosis in cattle.

4. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, es causada por una bacteria Gram negativa del género *Leptospira spp.* orden Spirochaetales (Faine y col., 1999). Afecta a animales domésticos como por ejemplo bovinos, equinos, caninos y suinos, pero también puede ocasionar infección en animales silvestres, mamíferos acuáticos y marsupiales (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010). La principal vía de infección es por contacto directo o indirecto con leptospiras a través de alimento y agua contaminada con orina de animales portadores (Dupouey y col., 2014).

Los animales infectados pueden abortar o ser portadores renales y/o genitales. La infección varía de acuerdo al serovar infectante y la especie. La enfermedad se presenta en forma clínica; aguda, sub aguda y crónica. La mayoría de los animales no presentan signos clínicos evidentes y suelen cursar la forma subclínica. La causa más común de leptospirosis en el ganado bovino es por el serovar Hardjo. La infección por este serovar produce, en el bovino, un estado de portador (Alder, 2015).

Los diferentes serovares pueden infectar a prácticamente cualquier especie, pero se ha demostrado que cada uno de estos serovares tiende a tener una especie específica como huésped de mantenimiento (Hathawai, 1981 citado por Alder, 2015). La importancia de la leptospirosis bovina radica en el impacto de ésta en la Salud pública e incluye los costos económicos del aborto, la pérdida de producción de leche y también los gastos asociados con la vacunación (Faine y col., 1999).

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar mediante el diagnóstico clínico, bacteriológico, serológico y molecular (Brihuega, 2008). Las pruebas serológicas son el procedimiento de laboratorio utilizado con mayor frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico y para realizar estudios epidemiológicos. La prueba de microaglutinación microscópica (MAT) y el ensayo inmunoabsorbente (ELISA) son los métodos de laboratorio más utilizados.

El MAT es la prueba “*Gold standard*” debido a su alta especificidad, pero presenta una baja sensibilidad pudiendo variar ésta según el estado de la enfermedad. La técnica detecta anticuerpos IgM como IgG (OIE, 2008). Es una prueba donde la muestra de suero a analizar se enfrenta a varios serogrupos de leptospiras. Los serogrupos reaccionantes se evidencian a partir de una reacción de aglutinación que se lee en el microscopio de campo oscuro (MCO). La técnica ELISA tiene algunas ventajas sobre el MAT, es relativamente sensible y específica. Es una prueba que se puede automatizar, no utiliza antígenos vivos y los resultados se pueden leer objetivamente (Surujballi y Mallory, 2004). Tiene la ventaja además que es simple de realizar y se puede utilizar en estudios epidemiológicos para determinar la seroprevalencia de leptospirosis en el ganado (Sakhaee y col., 2010). Una de las desventajas de esta prueba es que en la mayoría de las pruebas de ELISA la muestra de suero es evaluada para un único o un grupo restringido de serogrupos. El objetivo de este trabajo es evaluar la prueba ELISA como una alternativa en el diagnóstico de leptospirosis bovina en Uruguay.

5. REVISION BIBLIOGRÁFICA

5.1 Agente.

La leptospirosis es una enfermedad causada por una bacteria que pertenece a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*. Estas son bacterias finas y móviles, tienen una estructura cercana a bacterias Gram negativas, aunque la tinción no es posible debido a la baja afinidad por la tinción de Gram, son aeróbicas y usan β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga como fuente de energía. Estas bacterias no se visualizan por luz directa, sino por microscopía de campo oscuro, no sobreviven al secado, ni en cultivos deshidratados, tejidos o agua contaminada, su naturaleza es esencialmente acuática; tienen un ancho de alrededor de 0,1 μm con un largo de 0,6 a 20 μm (Faine y col., 1999). Presentan extremos en ganchos, son flexibles, y su movilidad es resultado de dos flagelos periplasmáticos de inserción polar (Baranton y col., 1995).

Se clasifican en tres grupos según su filogenia y patogenicidad (Cerqueira y col., 2009). Encontramos saprofitas de vida libre, patógenas intermedias y patógenas (Tabla I) Las leptospirosis se agrupan en serovares de acuerdo a sus propiedades antigénicas (Faine y col., 1999), existen más de 300 serovares distintos de leptospirosis patógenas reconocidos, que se agrupan en 25 serogrupos (Picardeau, 2013). Los diferentes serovares se identifican por medio de pruebas de aglutinación cruzada con sueros hiperinmunes específicos de conejo, así como técnicas moleculares. Es importante mencionar que un serogrupo se define como un conjunto de serovares que comparten similitud en el antígeno O del lipopolisacárido de superficie (Faine y col., 1999). Los sistemas de clasificación basados en similitudes genéticas son utilizados actualmente y se utilizan junto con la clasificación basada en antigenicidad (Alder, 2015).

Tabla I. Especies descritas del genero *Leptospira spp.* (Picardeau,2013).

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
Patógenas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60
<i>L. alstonii</i>	No determinado	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	No determinado	No determinado	Bejo-Iso 9
Intermedias			
<i>L. wolffii</i>	No determinado	No determinado	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	No determinado	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Sin asignar		5399
Saprofitas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC

L. meyeri	Semarang	Semarang	Veldrat
L. biflexa	Semarang	Patoc	Patoc 1
L. vanthielii	Holland	Holland WaZ No	Holland
L. terpstrae	No determinado	determinado	LT 11-33
L. yanagawae	Semarang	Saopaulo	Sao Paulo

5.2 Epidemiología de la enfermedad.

Un animal se infectará con serovares mantenidos por la misma especie, o por serovares mantenidos por otras especies de animales presentes en la zona. Factores sociales, de gestión y ambientales promueven el contacto y la transmisión de leptospiras (Figura 1). Las infecciones accidentales son más comunes en climas cálidos y húmedos, con saneamiento deficiente y con falta de control de roedores (Ellis, 2015). La supervivencia de los serovares patógenos de leptospiras fuera del huésped, es una característica única dentro de las espiroquetas, factor importante que contribuye al mantenimiento de ciclos de infección en huéspedes de mantenimiento y aumento del riesgo de infección para huéspedes accidentales. La supervivencia de esta bacteria fuera del huésped, también está dada por el calentamiento global y el aumento de las precipitaciones (Hartskeerl y *col.*, 2011).

La viabilidad del microorganismo en el ambiente depende básicamente de las condiciones de pH del suelo, temperatura y humedad del medio. La bacteria es sensible a un pH inferior a 6 o superior a 8, también a temperaturas ambientales menores a 7° o superiores a 36° (Radostits y *col.*, 2002). La bacteria no sobrevive en orinas ácidas. Su crecimiento es más favorable en orinas alcalinas; animales con dietas que producen orinas alcalinas favorecen su supervivencia en el ambiente (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010). La presencia de fuentes de agua superficial, sistemas de cría semi-intensiva; son factores que se relacionan a la enfermedad (Cortizo y *col.*, 2014). Se puede mencionar como principales factores de riesgo de infección para el serovar Hardjo, la introducción de bovinos portadores en rodeos libres, acceso de los animales a aguas superficiales contaminadas como arroyos, ríos y pastoreo mixto de ovinos y bovinos (Genovez y *col.*, 2011).

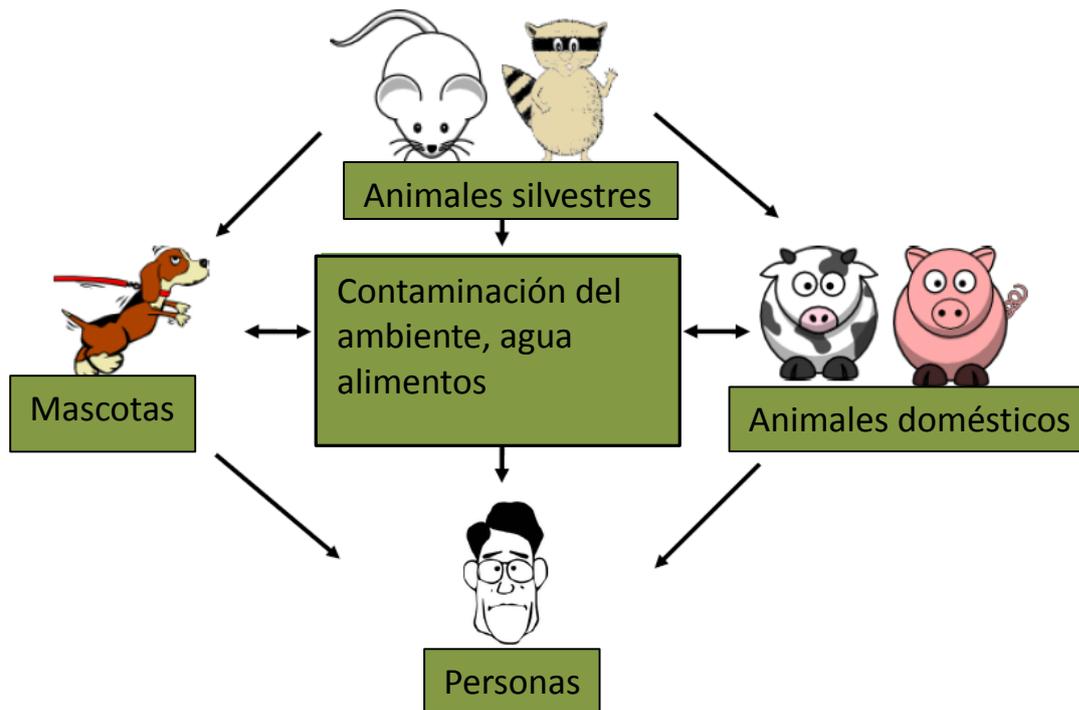


Figura 1. Ciclo epidemiológico de la Leptospirosis. Transmisión puede ser directa o indirecta.

5.3 Prevalencia.

Diferentes estudios se han publicado en el mundo en referencia a la prevalencia de la enfermedad, los resultados publicados varían entre países e incluso dentro de una misma región. Esto puede deberse a varios factores, tales como la técnica diagnóstica usada, el panel de antígenos utilizado, el tipo de rodeo muestreado, el estado inmunitario. Se puede mencionar por ejemplo trabajos en Nueva Zelanda donde *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo y *Leptospira interrogans* serovar Pomona son los serovares más comunes en el ganado de ese país (Fang y col., 2014). De forma similar en otra publicación del mismo país, 2308 bovinos fueron analizados y 50% de los mismos, presentaban anticuerpos contra Hardjobovis, 25% contra Pomona y 58% con cualquiera de los serovares (Dreyfus,2013).

A nivel europeo, se encuentran datos de prevalencia en el norte de España usando seis serovares de *Leptospira interrogans* como panel de antígenos para MAT, en este estudio fueron testeados 3578 animales, de los cuales 371 presentaron anticuerpos y los serovares más comunes fueron Pomona 5,59% y Grippotyphosa 2,37% mientras que el serovar Hardjo 0,75%, Icterohaemorrhagiae 0,64%, Poi 0,64% y Autumnalis 0,36% se encontraron en frecuencias más bajas (Espy y col., 2000).

En la región de México, se analizaron resultados de 4043 sueros de bovinos utilizando como técnica al MAT; con un panel antígenos de referencia más 3 antígenos provenientes de aislamientos de ese país. El análisis mostro 31,1 % de prevalencia y las serovares más encontrados fueron Hardjo, Wolffi y Tarassovi (Moles y col., 2002).

En América del Sur, podemos mencionar trabajos publicados en la región como por ejemplo en Brasil, Rocha de Almeida y col. (2016) evaluaron muestras de suero de

285 animales en el municipio de Ipameri, Estado de Goiás, obteniendo una prevalencia en el ganado de 18,9%. Los serovares fueron Hardjo, Wolffi, Canicola, Hebdomadis, Australis, e Icterohaemorrhagiae.

Por otro lado, en Paraíba, se muestrearon 2343 bovinos de diferentes establecimientos con un porcentaje bajo de animales vacunados contra leptospirosis. Los autores reportaron una seroprevalencia predial de 87,7% para al menos un serovar, siendo Hardjo el serovar más prevalente con 16,0% (Lage y col., 2007). De forma similar, en la región de Sorocaba empleando un panel de 26 antígenos para el MAT, se obtuvo una prevalencia de 51,1% (Genovez y col., 2011).

En Argentina, Brihuega (2013) menciona una alta seroreactividad a leptospirosis en animales estudiados; encontrando en 5085 sueros bovinos 57% positivos, en 253 sueros equinos 59%, en 125 sueros porcinos 57%, en 235 sueros caprinos 11% de positivos y sobre 204 sueros caninos 18% de positivos. Brihuega (2013), menciona aislamientos de *Leptospira spp.* a partir de bovinos, ovinos, porcinos, equinos, caninos, y diferentes animales silvestres. La especie y serovariedad predominante fueron *Leptospira interrogans* serovar Pomona, siguiendo; *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, *Leptospira borgpetersenii* serovar Castellonis y *Leptospira interrogans* serovar Canicola.

En Chile para determinar la seroprevalencia de *Leptospira spp.* a nivel de rodeos lecheros en el sur de ese país, analizaron 1537 bovinos sin signos clínicos de enfermedad. En el estudio se tomaron muestras de sangre individuales y se utilizaron 6 serovares de leptospira de referencia en el MAT. Resultando que el 75% de los diferentes rodeos mostró títulos serológicos frente a uno o más serovar de leptospira. Donde *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo fue el serovar más frecuente 81% en animales con resultado positivo (Salgado y col., 2014).

5.4 Estudios Nacionales.

Los primeros estudios en el Uruguay datan de 1958 donde el Dr. Echenique y Br. Sosa de Caruso visualizan formas espiroquetales compatibles con *Leptospira spp.* en cultivos de médula ósea de bovino de 20 días. En el año 1959, el Dr. Casas Olascoaga reprodujo la enfermedad en cobayos con orina de caninos y aisló microorganismos con morfología compatible con *Leptospira spp.* (Caffarena y col., 1971). A nivel de estudios serológicos encontramos el trabajo realizado por Caffarena y col. (1971) donde analizaron diferentes especies de animales provenientes de frigoríficos, mataderos y de saneamiento de bovinos lecheros. Mediante MAT se procesaron 1048 sueros de bovinos de carne y se obtuvo una prevalencia de 24,4%. Los serovares más prevalentes fueron Hebdomadis, Ballum, Tarassovi, Pomona, Grippytyphosa e Icterohaemorrhagiae. En bovinos lecheros de 666 sueros analizados hubo una seropositividad de 66,1% siendo los serovares más frecuentemente encontrados Hebdomadis, Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa, Ballum, Icterohaemorrhagiae Bataviae y Bratislava.

Repiso y col. (2005) obtuvieron una seroprevalencia para leptospirosis de 71,2% a nivel nacional y 38,5% en bovinos de carne, predominando los serovares Hardjo y Wolffi en ganado de carne.

Easton y col. (2003), estudió las principales causas infecciosas de abortos en bovinos de fetos recibidos en la División de laboratorios veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), de 99/431 fetos se detectaron anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira spp.* en líquido fetal, en suero materno o en ambos con títulos que los vinculan con el aborto.

En el período comprendido entre los años 2008-2012, el 56% de las muestras remitidas al Servicio de Leptospirosis del DILAVE fueron reactivas al MAT. Los serovares con mayor presencia desde el punto de vista serológico en la población bovina fueron Hardjo-prajitno, Hardjo-bovis, Wolffii y Pomona (Suanes, 2013).

Podemos mencionar, datos recientes publicados por Zarantonelli y col. (2018); dicho estudio tenía como objetivo el aislamiento y caracterización de *Leptospiras spp.* en ganado bovino con problemas reproductivos. Los autores combinaron serología y técnicas moleculares para la identificación de las cepas. En el periodo de estudio; identificaron 40 cepas de campo encontrando *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki (20 cepas), *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola (1 cepa), *Leptospira borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo (10 cepas) y *Leptospira Noguchii* (9 cepas). De los animales muestreados se encontraron que el 20% eliminaban leptospiras patógenas en su orina. En la mencionada investigación los animales eran de establecimientos lecheros y de carne. En ese estudio la técnica MAT detectó 76,6% de los focos que dieron PCR positivos y la tasa de aislamientos de *Leptospiras spp.* promedio fue de 4,5% (Zarantonelli y col., 2018).

5.5 Patogenia.

Las leptospiras pueden infectar al huésped a través de membranas mucosas como cavidad bucal, narinas o genitales, o también por soluciones de continuidad de la piel. Una vez dentro del animal, se unen a las células epiteliales y se adhieren a la matriz extracelular, a través de un proceso que afecta a las proteínas de membrana. Luego circulan por el torrente sanguíneo donde ocurre la fase de bacteriemia, diseminándose y multiplicándose por múltiples órganos, como hígado, bazo, riñones (Radostits y col., 2002).

La presentación aguda puede manifestarse con septicemia, hemorragias, hepatitis, nefritis y meningitis. En la fase de septicemia las leptospiras productoras de hemolisina provocan hemoglobinuria como consecuencia de hemolisis intravascular. Esta hemolisis depende del serovar actuante. Generalmente se asocia a infecciones agudas con serovares productores de hemolisina como Pomona o Icterohaemorrhagiae. La muerte del animal puede ocurrir por septicemia, anemia hemolítica y uremia consecuencia de la nefritis (Faine y col., 1999).

La presentación crónica se da en animales portadores, el aborto se da semanas después de la infección, el feto normalmente presenta una marcada autólisis y en algunos casos ictericia. La invasión bacteriana en esta etapa tardía de gestación es consecuencia de la invasión placentaria (Radostits y col., 2002).

En animales portadores, estas bacterias pueden alojarse en riñones en la región de la medula o corteza, en cerebro, humor acuoso y tracto genital. En los túbulos renales del animal infectado migran a través del espacio intersticial del riñón para luego ser excretadas en la orina, que es la fuente de infección para otros mamíferos. La inmunidad, depende de los mecanismos humorales siendo el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa uno de los antígenos más importantes (Faine y *col.*, 1999).

Los anticuerpos aglutinantes dirigidos contra estos antígenos son protectores pero específicos del serogrupo, evitando la protección cruzada entre la mayoría de los serovares. Los anticuerpos actúan aglutinando leptospiras, reduciendo su potencial de adherencia u opsonizando y potenciando su fagocitosis (Wang y *col.*, 1984).

La aparición de los anticuerpos es detectable después de 10 a 14 días del comienzo de la infección y alcanzan un nivel máximo 3 a 6 semanas después. Estos se mantienen por 6 semanas aproximadamente dependiendo la especie para luego comenzar a descender. El período de incubación depende de la dosis infectante, la tasa de crecimiento, toxicidad, y la inmunidad del hospedador (Ellis, 2015).

5.6 Signos Clínicos.

La enfermedad se presenta en forma aguda, sub aguda y crónica. La leptospirosis en el ganado bovino se presenta principalmente con problemas reproductivos como infertilidad, partos prolongados, abortos, ocurrencia de mortinatos y terneros débiles. La infección persistente del tracto reproductivo puede ser la manifestación más importante en rumiantes, principalmente cuando el serovar Hardjo está involucrado (Ellis, 1994). Los animales portadores de serovares adaptados al huésped (huésped de mantenimiento) no desarrollan síntomas clínicos evidentes en cambio; sí un animal se infecta con un serovar no adaptada al huésped (huésped accidental) presentará síntomas agudos de la enfermedad (Faine y *col.*, 1999).

La manifestación de la forma aguda es similar en todos los animales, los terneros son los más susceptibles a esta forma de la cual se manifiesta por septicemia con fiebre alta, petequias en mucosas, anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria, ictericia y palidez de mucosas como consecuencia de la anemia; el ternero presenta taquicardia tono cardiaco fuerte y disnea. La mortalidad es alta (Radostits y *col.*, 2002).

En el ganado adulto se puede producir abortos y en caso de ganado lechero, se puede observar alteraciones en el flujo y la calidad de la leche (Alder, 2015).

La forma sub aguda la presentación es similar pero menos acentuada que la forma aguda los animales no presentan todos los signos (Radostits y *col.*, 2002).

La presentación de la forma crónica debe tenerse en cuenta cuando se presentan abortos; que ocurren normalmente en el último trimestre de la gestación y se presentan en grupo de vacas en forma de brote. Puede haber hipogaláctia en vacas en periodo de lactación. A medida que las vacas adultas desarrollan inmunidad para el serovar Hardjo, las vaquillonas son la categoría más susceptible de presentar abortos (Radostits y *col.*, 2002).

5.7 Patología.

Las alteraciones macroscópicas y microscópicas son similares en todas las especies de animales que sufren infección por *Leptospira spp.* Los órganos más afectados son riñón, hígado, pulmones y corazón (Faine y col., 1999). A nivel macroscópico suelen observarse, petequias, hemorragias e ictericia. Los cambios vasculares predisponen al daño isquémico de los tejidos, lo que lleva a la necrosis de los órganos. Los hallazgos comunes son nefritis, hepatitis, encefalopatía, meningitis, placentitis y aborto (Faine y col., 1999).

La colonización por parte de esta bacteria en los tejidos es esencial para el establecimiento de la enfermedad, donde la presencia de adhesinas, motilidad y quimiotaxis contribuyen al desarrollo de la infección (Nascimento y col., 2004). En la bacteriemia, el hígado es el primer órgano en ser alcanzado en el organismo donde causa necrosis de las células hepáticas, colestásis intrahepática, que resulta en disminución de excreción de bilirrubina (Faine y col., 1999). Las lesiones pueden ser en la región periportal, en el caso de riñones las lesiones se localizan principalmente en la unión cortico medular, también en el área cortical y medular (Mineiro y col., 2011).

A nivel microscópico la invasión bacteriana puede estar mediada por la secreción de enzimas capaces de degradar las membranas de la célula huésped (Nascimento y col., 2004). Las lesiones en riñones se caracterizan por necrosis de las células tubulares, presencia de células apoptóticas, presencia de células inflamatorias alrededor de los túbulos renales e infiltrados (Nally y col., 2004). En la lesión primaria, se observa, daño en las membranas celulares endoteliales, vasculitis e infiltrados inflamatorios con presencia de células plasmáticas, monocitos, histiocitos y neutrófilos (Levett, 2001, Mineiro y col., 2011).

5.8 Pruebas Diagnósticas.

Dado que la leptospirosis suele cursar de forma subclínica en la gran mayoría de los animales, las herramientas de laboratorio son fundamentales para llegar a un correcto diagnóstico de la enfermedad. Para esto, hoy en día las pruebas diagnósticas son de dos tipos, las directas que detectan la presencia de la bacteria o su ADN en diversos tejidos o sangre y las de tipo indirectas, o serológicas, que detectan la presencia de anticuerpos en suero (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010, Alder, 2015). El tipo de diagnóstico, depende de qué momento de la enfermedad que se está cursando y el método a utilizar como se puede observar en la siguiente figura.

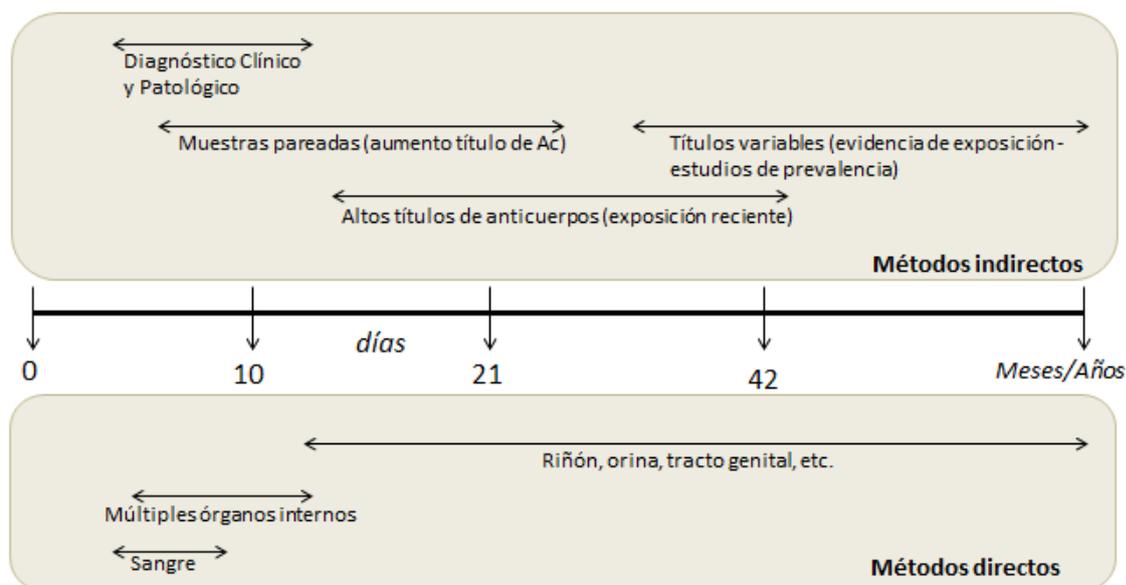


Figura 2. Pruebas diagnósticas serológicas y de detección del microorganismo, según etapa de infección Alder (2015) adaptado por Dr. Fernando Goday 2018.

Las alternativas del diagnóstico de laboratorio para leptospirosis bovina consisten en examen directo de muestras sospechosas en microscopio de campo oscuro (MCO); cultivo de leptospiras a partir de muestras clínicas; detección de anticuerpos a partir de pruebas serológicas y detectar la presencia de ADN por técnicas de biología molecular (Faine y col., 1999).

5.9 Métodos Directos.

5.9.1 Aislamiento.

Este tipo de técnica tienen el objetivo de aislar el agente e identificarlo. En caso de cultivos estos se realizan en medios específicos, que contienen suero o albumina; también medios enriquecidos con suero de conejo, el medio más utilizado está compuesto de suero bovino, albumina, ácido oleico y polisorbatos (Tween) llamado medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Faine y col., 1999). Las siembras de muestras de orina o de diferentes órganos, se incuban en estufa a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, se observan al MCO semanalmente por lo menos 16 semanas hasta 26 semanas aproximadamente. El cultivo es una técnica laboriosa, los mismos se pueden contaminar con diferentes microorganismos, los cuales inhiben el crecimiento de las espiroquetas, no es un procedimiento que se utiliza de rutina de diagnóstico. Pero si es utilizado para estudios epidemiológicos, como de aislamientos (Marquez, 2017). La demostración de la presencia de las bacterias en sangre, leche y órganos de animales que muestran signos clínicos en cuadros agudos, tiene valor diagnóstico, pero con la desventaja, que la bacteriemia es pasajera (OIE, 2008).

5.9.1 PCR.

La presencia de ADN de leptospiras en tejidos o fluidos, incluyendo sangre y orina, se puede demostrar empleando diversas pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser en tiempo real o en formatos clásicos a tiempo fijo (OIE, 2008).

Esta técnica revela la presencia de leptospiras patógenas en las diferentes muestras biológicas, pero en ningún caso permite identificar directamente el serovar causante de la infección (Picardeu, 2013).

La técnica, presenta una alta sensibilidad y especificidad, siendo rápida y simple cuando se cuenta con los equipos e infraestructura necesaria para su ejecución (Loureiro y col., 2013). La principal limitación de su uso, es que un resultado negativo a PCR, no descarta la posibilidad de que el animal esté infectado, ya que la excreción por orina es intermitente en el ganado (Hamond y col., 2014).

La técnica se basa en una amplificación enzimática de una secuencia de ADN diana a través de una serie de polimerizaciones llevadas a cabo por un ADN polimerasa termoestable. La especificidad del ensayo se puede ajustar mediante la elección del fragmento corto de ADN, llamado cebador. Los primeros cebadores diseñados, se desarrollaron a partir del serovar Hardjo, para detectar ADN en orina de bovinos infectados (Van Eys y col., 1989).

La sensibilidad de la técnica es adecuada, con un límite de detección de alrededor de 1×10^2 leptospiras por mililitro de muestra (Limmathurotsakul y col., 2012).

En el caso de PCR en tiempo real es una técnica que permite mejorar los PCR convencionales, porque la detección de ADN es en forma más rápida y reduce los resultados falsos positivos causados por contaminación. Varios protocolos de PCR en tiempo real, han sido desarrollados los cuales son específicos para leptospiras patógenas (Fang y col., 2014).

Un ejemplo de amplificación de ADN mediante PCR en tiempo real, es el uso de esta técnica en combinación con MAT para diagnóstico. En un estudio realizado en ovinos y bovinos de Nueva Zelanda los autores tomaron muestras de orina, riñones y sangre de 399 ovinos y 146 muestras de bovinos. Las muestras de orina y riñón fueron analizadas por PCR en tiempo real, mientras que las muestras de suero se analizaron mediante MAT. En total de las muestras analizadas, el 27% de las muestras de orina dieron positivas por PCR. Resultando 31% para ovinos y 21% para bovinos. Mientras que usando MAT con un panel de antígenos que incluía los serovares Hardjo bovis y Pomona la seroprevalencia, fue de 61%. Entre los animales seropositivos, 41% dieron resultados positivos para PCR (Fang y col., 2014).

El uso de esta técnica, también se puede ver en un relevamiento de leptospirosis hecho en Parnaíba, Brasil, donde los autores estudiaron la presencia de ADN de *Leptospira spp.* mediante PCR. Usaron 60 muestras de suero, muestras de orina y diferentes órganos de ganado lechero sin vacunar, además el estudio incluyó histopatología, y serología para MAT. Los autores del trabajo concluyen que, la presencia de ADN de *Leptospira spp.* fue detectado en orina, para el total de animales con serología positiva al MAT y el ADN en riñones fue detectado en el 50% de animales con serología positiva (Mineiro y col., 2011).

En Uruguay podemos mencionar el estudio realizado por Zarantonelli y col. (2018) que utilizan PCR para la detección de ADN específico de especies patógenas de

Leptospira spp. para ello amplificaron el gen *LipL32* a partir de muestras de ADN extraídas de orinas. Encontrando los autores que de un total de 963 muestras de orina confirmaron la presencia de ADN en 193 muestras. De las 963 muestras procesadas; 42 de las mismas dieron cultivos positivos a leptospiros y de estas 9 resultaron negativas al PCR. Los autores plantean que estas orinas negativas no amplificaron en el PCR, consecuencia de la inhibición de la orina.

5.10 Métodos Indirectos.

Otra alternativa para el diagnóstico es el uso de técnicas que detectan los anticuerpos que se producen en respuesta a la infección. Los anticuerpos de las leptospiros aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses, en algunos casos años. En animales que permanecen infectados crónicamente los títulos pueden que no sean detectados. Muestreos que se realicen previos a la seroconversión durante la etapa aguda de la enfermedad pueden dar resultados falsos negativos (Picardeau, 2013).

5.10.1 MAT.

La prueba de microaglutinación microscópica (MAT) es el método de laboratorio más utilizado, seguido del análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

El MAT es considerado la “prueba de oro” recomendada por la OIE, (2008) para el diagnóstico de leptospirosis por su alta especificidad diagnóstica. Es una prueba que requiere de personal entrenado, lleva tiempo y es necesario el mantenimiento de un panel de leptospiros vivos, los cuales requieren de repiques semanales y son sensibles a la contaminación con otras bacterias. Para mejorar la sensibilidad de la técnica, es fundamental usar serogrupos representativos de la región, ya que los anticuerpos no pueden ser detectados cuando el serogrupo causante no está representado en el panel utilizado (Guía OPS/OMS, 2008).

En caso de animales que recientemente son vacunados, el MAT no puede diferenciar si los anticuerpos detectados, son por infección o por vacunación. Por lo tanto, la vacunación del rodeo, interfiere con la interpretación de la prueba (Faine y col., 1999). Los títulos de anticuerpos desarrollados a la vacunación son bajos (1:100 a 1:400) respecto a los de infección y son en respuesta a los serogrupos incluidos en las vacunas. Estos pueden persistir durante seis meses (Bolin C., 2003).

Puede haber interpretación errónea de la técnica, si no se tiene en cuenta la reacción cruzada de anticuerpos ya que un animal en respuesta a una infección con un serovar de *Leptospira spp.* puede reaccionar de forma cruzada con otros serovares y es probable que un bovino infectado; tenga anticuerpos contra más de un serovar en una prueba de aglutinación. Sin embargo, el serogrupo infectante tiende a desarrollar títulos más altos (Bolin C., 2003).

La sensibilidad del MAT es variable de acuerdo a múltiples factores. Por un lado, es una técnica subjetiva, que depende del operador. Por el otro, depende si la infección es aguda o crónica (Cumberland y col., 1999, Limmathurotsakul y col., 2012) y de la elección de serovares (Levett, y col., 2003).

Diferentes trabajos han sido publicados que muestran las diferencias en la sensibilidad y especificidad del MAT. Bajani y col. (2003) evaluaron el MAT con respecto a 4

diferentes test de diagnóstico, usaron sueros de casos de leptospirosis e informaron una sensibilidad del 93,2% y una especificidad del 95,8% para la técnica de referencia. Por otro lado, Pinto y col. (2015) evaluaron si el uso de cepas locales de *Leptospira* aumentaba la sensibilidad del serodiagnóstico de leptospirosis en bovinos, para el estudio, tomaron muestras de sangre y orina de 314 bovinos al azar en Rio de Janeiro, Brasil. El diagnóstico serológico se hizo utilizando un panel con cepas de referencia, identificando como seroreactivas al 55,1% de las muestras; cuando se incluyeron cepas locales como antígenos hubo un aumento significativo en la sensibilidad de la técnica a 65,0%.

5.10.2 ELISA.

La especificidad y la sensibilidad del ELISA varía según diferentes autores. En la actualidad hay diferentes kits comerciales disponibles, basados fundamentalmente en la detección de anticuerpos de *Leptospira spp.* (Picardeau, 2013). Estos kits comerciales pueden detectar anticuerpos que pueden ser género específico de *Leptospira spp.* y por lo tanto no es adecuada para la identificación de serovar o serogrupo o detectar anticuerpos a nivel de serovares (Musso y col., 2013). La proteína *LipL32* es la principal proteína de superficie estudiada como antígeno en protocolos para su uso en diferentes animales, tiene la característica de estar altamente conservada entre especies patógenas, y ausente en especies saprófitas. Se puede mencionar además de *LipL32*, otras proteínas de superficie de la membrana externa que han sido identificadas como, por ejemplo, *LipL36*, *LipL41*, *Loa22*, familia *Len*, y las proteínas *Lig* (Loureiro y col., 2013).

Los antígenos utilizados para ELISA se han preparado usando una gran variedad de técnicas, se puede mencionar algunos ejemplos como: el uso de extracción con fenol y agua caliente (Thiermann, 1983; citado por Bomfim y col., 2005) también se puede mencionar el uso de leptospirosis enteras sonicadas (Bercovich y col., 1990), extracción con ácido acético (Surujballi y col., 1997a), extracción con formol (Terpstra y col., 1985) y extracción con sulfato (Yan y col., 1999).

La técnica tiene la ventaja de ser objetiva, sencilla y rápida, pudiéndose usar, fundamentalmente a nivel predial cuando se deben diagnosticar muchos animales, o en estudios de prevalencia. La prueba tiene la capacidad de detectar tanto anticuerpos IgG como anticuerpos IgM, mostrando resultados precisos (Canal y col., 2013, Chen y col., 2013, Vedhagiri y col., 2013).

Diferentes ensayos publicados muestran que ELISA ha sido más sensible que el MAT, pero tiene una serie de desventajas que incluye: falta de especificidad y que no siempre los niveles de anticuerpos reflejan el estado inmune del animal (Surujballi y col., 1997a, Surujballi y col., 1997b).

En una publicación se evaluó un ELISA capaz de detectar anticuerpos del tipo IgM específicos de *Leptospira*. Un total de 819 muestras de suero, se analizaron con MAT como prueba de referencia. El ELISA se desarrolló a partir de un preparado de *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge, el test mostró una sensibilidad de 94% y 99% de especificidad (Bourhy y col., 2013).

Otro trabajo publicado podemos ver el uso de un test ELISA que tenía como antígeno de *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge, capaz de detectar anticuerpos del tipo IgM, las muestras serológicas eran a partir de animales infectados y no infectados. Los autores reportan para el test, una alta sensibilidad de 95,6% y una especificidad de 93,0% (Penna y col., 2017).

En otro trabajo, se evaluó el uso del ELISA como prueba diagnóstica para estudios de seroprevalencia en Japón. Los autores utilizaron un kit de ELISA específico para el serovar Hardjo tipo Hardjo bovis y Hardjo prajitno, este kit detectaba anticuerpos del tipo IgG. Muestrearon 190 animales sin vacunar y concluyeron que la prueba tenía una sensibilidad de 94,1% y especificidad de 94,8% siendo la prevalencia de la enfermedad de 65,1% (Miyama y col., 2018).

5.10.3 ELISA vs MAT.

Podemos mencionar trabajos que comparan las técnicas de diagnóstico serológico entre MAT y ELISA.

Bercovich y col. (1990) desarrollaron un test ELISA a partir de un sonicado de *Leptospira* serovar Hardjo y compararon los resultados obtenidos con MAT. Para evaluar la sensibilidad del ELISA usaron sueros de terneros infectados experimentalmente con *Leptospira* serovar Hardjo bovis. También usaron 704 sueros de bovinos adultos para estudiar especificidad del ELISA para el serovar Hardjo. Los autores utilizaron sueros de terneros infectados experimentalmente con diferentes serovares; Copenhageni, Grippytyphosa, Canicola o Pomona. Siendo estos no reactivos al ELISA. También usaron 227 sueros positivos al MAT, pero no reactivos a serovar Hardjo, solamente reaccionando 3 sueros al ELISA, los cuales eran reactivos al serovar Grippytyphosa en el MAT. Los autores establecieron un 90% de correlación en las técnicas.

Cousins y col. (1985) desarrollaron un ELISA a partir de un sonicado de *Leptospira interrogans* serovares Hardjo, Pomona y Tarassovi. Los autores analizaron bovinos inoculados experimentalmente con los mismos serovares; compararon MAT y ELISA para la detección de anticuerpos IgM e IgG. El ELISA usado detecto anticuerpos IgM específico contra los serovares en todo el ganado infectado 1 semana después de la inoculación. Los anticuerpos IgG aparecieron al mismo tiempo o después que los anticuerpos IgM, persistiendo durante más tiempo. Los autores plantean, que el ELISA desarrollado es una alternativa para el diagnóstico de leptospirosis en el ganado ya que fue capaz de detectar a la mayoría de los animales inoculados experimentalmente.

Podemos mencionar otro trabajo en Canadá, donde utilizaron un ELISA capaz de detectar anticuerpos de *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Para la evaluación, usaron 190 sueros de bovinos que tenían títulos de Pomona en el MAT y 1445 sueros negativos al mismo serovar. También evaluaron 210 sueros proveniente de ganado libre de patógenos que resultaron negativos al MAT. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron 93,7% y 96,3%, respectivamente (Surujaballi y Mallaroy, 2001). Los mismos autores, Surujaballi y Mallaroy (2004) realizan otro estudio, en donde desarrollaron un ELISA indirecto a partir de 6 cepas de leptospiras sonicadas,

Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjobovis, Pomona y Sejroe. Utilizaron 3107 sueros de bovinos negativos al MAT y 601 sueros positivos. Además, el ensayo incluyó 5 bovinos que fueron infectados experimentalmente con diferentes serovares, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa y Hardjo bovis. Los resultados publicados por los autores establecen, que la sensibilidad y la especificidad relativa del ensayo fue de 93,5% y 94,7%, respectivamente. El ELISA fue capaz de detectar anticuerpos en los sueros de los animales infectados experimentalmente y los anticuerpos en los sueros de los animales de campo.

Sakhaee y col. (2010) a partir de sonicado de 6 serovares de *Leptospira interrogans* realizan un ELISA y determinan la correlación de los resultados con la técnica MAT. Para ello utilizaron un total de 355 sueros de animales de Teheran. Para la técnica de MAT usaron como panel de antígenos los siguientes serovares: Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, y Ballum. De los sueros analizados 87 dieron positivos a cualquier serovar, mientras que en el ELISA reaccionaron 77 sueros. Los autores concluyeron que hay una alta correlación entre las pruebas.

El Jalii (2008) analizo 170 muestras de suero bovino al azar de establecimientos de ganado. Las muestras de suero fueron examinadas usando ELISA y MAT. El autor uso un panel de 6 serovares para realizar el MAT. El test ELISA utilizado; era antígeno específico para el serovar Hardjo. De la evaluación resulto 56,5% de los sueros positivos a ELISA, mientras que 27,7% de los sueros positivos a MAT. Todos los sueros positivos al MAT también fueron para el ELISA y no hubo sueros positivos al ELISA y negativos para MAT. El trabajo concluye que el ELISA fue 100% sensible.

En Turquía, Ertas y col. (2002) recolectaron 275 sueros bovinos de diferente sexo y edad, utilizaron MAT con un panel de antígenos de 5 serovares y compararon con un ELISA desarrollado a partir de extractos de *Leptospira* serovar Hardjo y Copenhageni obteniendo como resultado, 16% de sueros positivos para MAT y 23,3% para ELISA.

Aslantas y col. (2004) en la región de Hatay, evaluaron 512 sueros bovinos de hembras y machos utilizando MAT y ELISA, los antígenos para el ELISA fueron preparados a partir de los serovares, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo y Patoc. Para la técnica de referencia MAT usaron 3 serovares. Resultando que 8,8% de los sueros fueron positivos a MAT y 14% positivos a ELISA. Observándose una mayor sensibilidad de ELISA frente al MAT. Obteniendo una sensibilidad y especificidad para ELISA de 82,2% y 94,2% respectivamente.

La eficacia de un ELISA fue evaluada para el diagnóstico de leptospirosis bovina; usando 321 muestras de suero bovino que provenían de animales con antecedentes de problemas reproductivos. Para la evaluación lo compararon con el MAT. Para ello utilizaron 8 serovares en el panel de antígenos. El test ELISA se desarrolló a partir de un antígeno recombinante *LipL41* de *Leptospira interrogans* serovar Canicola. El valor de sensibilidad fue de 100% y especificidad de 85,3% (Mariya y col., 2006).

Otro trabajo realizado en Brasil en el cual se analizaron 150 muestras de suero de ganado lechero; sin vacunar y con sospecha de leptospirosis. Los autores obtuvieron 125 (83,3%) muestras con títulos positivos de aglutinación para MAT utilizando un

panel de 21 serovares. De las muestras positivas y analizadas mediante ELISA utilizando el antígeno de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni *LipL32*, se pudo ver que el test detectó a las 125 muestras positivas. Los autores concluyen que la sensibilidad de ELISA fue de 100%. En cuanto a la especificidad evaluaron 58 sueros negativos a MAT obteniendo, un valor de 100% de especificidad del ELISA respecto al MAT (Bomfim y col., 2005).

En un trabajo realizado en el mismo país en la zona del Pantanal, compararon estas técnicas utilizando 282 sueros de ganado sin vacunar contra leptospirosis, resultando 143 sueros positivos a MAT, y analizados mediante ELISA realizado a partir de la proteína recombinante *LipL32* se obtuvo 161 sueros positivos. La prueba ELISA tuvo una sensibilidad del 99,3% y la especificidad fue del 86,3% (Tomich y col., 2007).

Aragão y col. (2012) compararon el desempeño del ELISA con el antígeno recombinante de *L. interrogans* serovar Copenhageni *LipL32*, el protocolo utilizado por los autores fue el desarrollado anteriormente por Bomfim y col. (2005). Para esto, recolectaron sueros de un total de 285 bovinos, ubicadas en la región lechera de Parnaíba, Brasil. De estas muestras 49% fueron positivas al MAT, con títulos que variaban de 1:100 a 1:3200, mientras que cuando se evaluó con el ELISA 57,5% fueron reactivas. Estos autores concluyeron que el ELISA con la *LipL32* recombinante era más sensible que el MAT.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General.

Evaluar una prueba de ELISA indirecto como alternativa al diagnóstico de leptospirosis bovina en Uruguay.

6.2. Objetivos Específicos.

- Determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA relativa a la prueba de referencia (MAT).
- Evaluar el acuerdo entre la prueba de ELISA y MAT para el diagnóstico de leptospirosis bovina.
- Evaluar diferentes puntos de corte para el ELISA a partir de la realización de la curva ROC (Receiver operating characteristic).

7. Materiales y Métodos

7.1 Selección de muestras

Para realizar este trabajo experimental, se contó con un marco de muestreo de 113 sueros de bovinos hembras (vacas y vaquillonas) provenientes de establecimientos ganaderos con antecedentes de problemas reproductivos y sin antecedentes de vacunación contra Leptospirosis.

Para estudiar la especificidad se usaron 40 muestras de suero de terneros, previo a la ingesta de calostro, de un predio sin antecedentes de la enfermedad, los mismos fueron donados por la Plataforma Salud Animal, INIA.

Se definió un animal infectado: si es reactivo a al menos un serovar por la técnica MAT y proviene de establecimientos con antecedentes reproductivos y/o de la enfermedad.

Se definió como animal no infectado: si es negativo a la prueba de MAT y proviene de un predio sin antecedentes de problemas reproductivos ni de la enfermedad.

La extracción de sangre se realizó a través de la veno-punción de la vena coccígea, se extrajeron 5 cc con agujas descartables de 18 G x 1½ y jeringas descartables de 10 ml. Posteriormente en el laboratorio y luego de producido el proceso de formación del coágulo, se centrifugó las muestras de sangre 10 minutos a 2000 r.p.m., se separó el suero, y se alicuotó en dos viales, que inmediatamente se congelaron en freezer a -20°C, hasta su utilización. Se incluyeron los datos de caravana de trazabilidad, fecha de colección, nombre y DICOSE del establecimiento. El suero extraído fue procesado en el laboratorio posteriormente por las pruebas de MAT y ELISA indirecto.

7.2 MAT

La detección de anticuerpos por medio de la prueba MAT se realizó con un panel de antígenos conformado por los siguientes serovares (ver Tabla II):

Tabla II. Serovares utilizados para detección de anticuerpos por medio del MAT en el laboratorio DILAVE-DGSG-MGAP.

Strain	Serogroup	Serovar
Pomona	Pomona	Pomona
Hardjobovis	Sejroe	Hardjo
Hardjoprajitno	Sejroe	Hardjo
3705	Sejroe	Wolfii
Ictero I	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Moskva V	Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hond Utrech	Canicola	Canicola

Para la interpretación de los resultados se utilizó un punto de corte de 1:100 y un título máximo de 1:6400. Las cepas utilizadas se sub cultivaron en tubos con medio EMJH a una densidad de 1×10^8 leptospiras/ml. Dichos cultivos fueron utilizados entre el cuarto y hasta el décimo día de crecimiento en estufa a 29°C. La viabilidad celular (densidad y movilidad) y la ausencia de contaminación se verificaron usando el

microscopio de campo oscuro (MCO). Se consideró a una muestra positiva cuando luego de la incubación y observación al MCO haya mostrado el 50% de aglutinación, dejando el 50% de leptospiras libres, al compararlo con un control que consiste en un cultivo de leptospiras diluido 1:2 en suero fisiológico (OIE, 2008).

7.3 ELISA.

La prueba de ELISA indirecto fue realizada con el kit PrioCHECK® L. Hardjo Ab (Prionics Lelystad, Países Bajos) bajo las recomendaciones del fabricante. Dicho kit detecta anticuerpos *Leptospira interrogans* serogrupo Sejroe serovar Hardjo en bovinos. Las muestras de suero se agregaron a los pocillos de una placa de microtitulación, la cual está recubierta con antígeno inactivado.

Los anticuerpos dirigidos contra L. Hardjo presentes en las muestras se unen al antígeno durante la incubación y se detectan con un anticuerpo anti-bovino conjugado con peroxidasa. Para visualizar el conjugado unido se incubo las muestras con la solución de sustrato cromógeno (TMB). Luego de la incubación se detuvo el desarrollo de color. Para finalizar; el color se midió a una longitud de onda de 450nm.

Finalizada esta etapa se procedió al cálculo de los resultados para ello; se calculó la media de la densidad óptica (DO) de los blancos utilizados en la placa, también se calculó la (DO) corregida de todas las muestras restándole la media de la (DO) de los blancos. El cálculo del porcentaje de positividad(PP) se realizó según la siguiente formula.

$$PP = \frac{\text{Media DO 450 de las muestras} \times 100}{\text{Media DO 450 del control positivo}}$$

Para la interpretación de resultados, las muestras se consideraron positivas si el PP era $\geq 45\%$, dudosas si estaban entre 20 y 45% y negativas si el PP era $< 20\%$.

Para la validación de la prueba se tuvieron en consideración los criterios de validación del ensayo establecidos por el fabricante del kit. La media de los blancos debía ser $< 0,150$. La (DO) corregida del control positivo debía ser $\geq 1,000$. La media del PP del control negativo debía ser < 20 . La media del PP del control positivo débil debía estar comprendida entre 20 y 60.

7.4 Análisis de datos.

Para la determinación de la sensibilidad y especificidad se utilizaron planillas Excel. Se utilizó el software estadístico STATA 15 para el análisis de los datos y para la determinación del índice Kappa y curva ROC.

8. RESULTADOS

8.1 Sensibilidad y Especificidad relativas.

Se utilizó el criterio de clasificación detallado en materiales y métodos para clasificar un animal “infectado” o “no infectado”. Esta clasificación primaria fue amplia, en el sentido que se identificó como animal “infectado” si la muestra de suero reaccionaba en el MAT a cualquiera de los serovares del panel en animales no vacunados. Para este análisis el “n” utilizado bajo este criterio de clasificación fue de 153 muestras de suero (MAT y ELISA). En la tabla III se muestran los resultados de las tablas de contingencia para la técnica de ELISA respecto al MAT (clasificación de animal infectado y no infectado). En la tabla IV se observa el resultado de la sensibilidad y especificidad del ELISA relativas al MAT.

Tabla III. Desempeño del ELISA usando como referencia al MAT criterio de clasificación: sueros reactivos a cualquiera de los serovares utilizados en el panel.

ELISA	Criterio de referencia		
	Infectado	No Infectado	Total
Positivo	112	5	117
Negativo	1	35	36
Total	113	40	153

Tabla IV. Resultado de Sensibilidad y Especificidad del ELISA relativas al MAT utilizando sueros reactivos a cualquiera de los serovares en el panel.

Sensibilidad	99,12% (94,45-99,95%)*
Especificidad	87,50 (72,40-95,31%)*

*95% IC Intervalo de Confianza

Un segundo análisis se basó en un nuevo criterio de clasificación para las mismas muestras, el mismo fue más preciso respecto a las serovares reactivas, teniendo en cuenta las especificaciones del kit de ELISA. Se consideró un animal “infectado” si el suero era reactivo en el MAT, al serovar Hardjo y un animal “no infectado” si era no reactivo al serovar Hardjo. Este nuevo criterio de clasificación se redefinió teniendo en cuenta que el kit de la prueba ELISA, únicamente detectaba animales infectados por la serovar Hardjo, no cruzando con otras serovares de Leptospiras. En la tabla V, se presenta los resultados del ELISA y MAT (según nuevo criterio de clasificación). Se puede observar que, para este nuevo criterio, las muestras analizadas se redujeron a 129. En la tabla VI, se muestra el resultado de

sensibilidad y especificidad, se puede observar que la sensibilidad y especificidad no cambian comparando ambos criterios de clasificación.

Por otro lado, se estudiaron los animales reaccionantes a MAT para cualquiera de las serovares del panel pero que no fueran reaccionantes a Hardjo. Se compararon dichos resultados con los que aportó la prueba de ELISA para los mismos animales. De los 24 sueros reactivos a MAT a cualquiera de las serovares (excluyendo a Hardjo) la prueba de ELISA detectó a todos como reaccionante, no existiendo diferencias entre las pruebas. La distribución por serovares de las 24 muestras no reactivas a serovar Hardjo fueron: 13 reactivas a serovar Pomona, 10 a serovar Wolffi y 1 a serovar Grippytyphosa.

Tabla V. Desempeño del ELISA usando como referencia sueros reactivos a serovar Hardjo en el MAT.

ELISA	Criterio de referencia		
	Infectado	No Infectado	Total
Positivo	88	5	93
Negativo	1	35	36
Total	89	40	129

Tabla VI. Resultado de Sensibilidad y Especificidad del ELISA relativas al MAT utilizando sueros reactivos a serovar Hardjo en el MAT.

Sensibilidad	98,88% (93,02-99,94%)*
Especificidad	87,50 % (72,40-95,31%)*

*95% IC Intervalo de Confianza

8.2 CURVA ROC

La curva ROC (figura 3) fue realizada tomando en cuenta los criterios de clasificación detallados en la (tabla III) clasificación de animal infectado y no infectado si la muestra de suero era reactiva a cualquiera de los serovares del panel. El área bajo la curva otorga un valor de 0,904 (Tabla VII), teniendo el ELISA una capacidad discriminatoria diagnóstica buena.

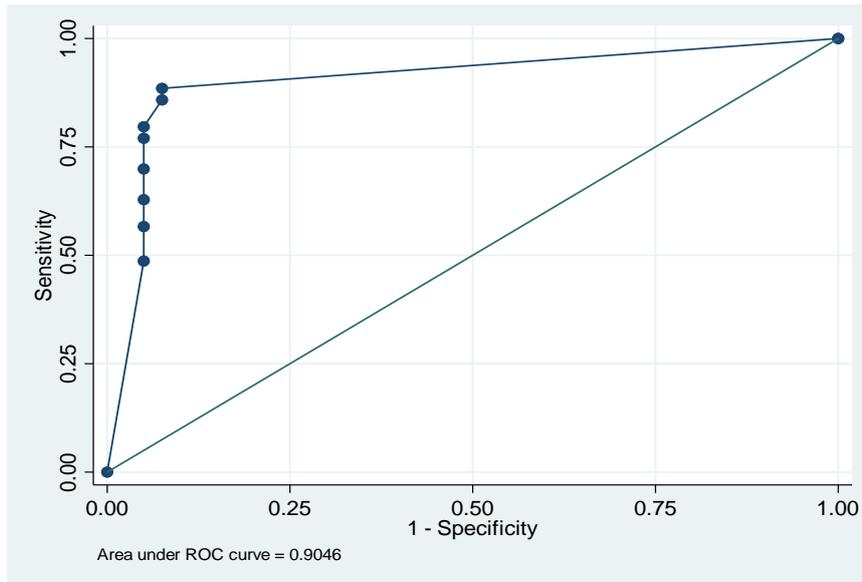


Figura 3. Gráfica de la curva ROC obtenida del análisis de los resultados de ELISA de todos los sueros estudiados. Se representa sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X).

Tabla VII. Valor del área bajo la curva ROC.

	ROC		Asymptotica Normal	
Obs	AREA	Error estándar	95%I.C.	
153	0,9046	0,0288	0,8482	0,9610

El valor de punto de corte que mejor discrimina las muestras es el 0,344 se puede ver señalado (tabla VIII) siendo el que recomienda el comerciante de 0,45.

Tabla VIII. Sensibilidad y Especificidad según diferentes puntos de corte.

Punto de Corte	Sensibilidad	Especificidad	Correctamente clasificado
≥ 27.22	100,00%	0,00%	68,99%
≥ 34.44	88,76%	92,50%	89,92%
≥ 41.66	87,64%	92,50%	89,15%
≥ 48.88	80,90%	95,00%	85,27%
≥ 56.11	78,65%	95,00%	83,72%
≥ 63.33	71,91%	95,00%	79,07%
≥ 70.55	64,04%	95,00%	73,64%
≥ 77.77	56,18%	95,00%	68,22%
≥ 85)	47,19%	95,00%	62,02%
> 85)	0,00%	100,00%	31,01%

8.3 Índice Kappa de Cohen

El Índice Kappa mide el acuerdo entre 2 pruebas diagnósticas, en este caso se determinó para la técnica de MAT respecto al ELISA (Tabla IX) para las 153 muestras analizadas por ambas pruebas. Según la clasificación de Galton (1892) especificada en la (Tabla X), el acuerdo entre ambas pruebas es casi perfecto ($k:0,89$).

Tabla IX. Valor de Índice Kappa de Cohen

Acuerdo%	Acuerdo esperado%	Kappa	Error estándar	Z	Prob>Z
96,08	62,63	0.8951	0.0806	11.10	0.0000

Tabla X. Clasificación de Galton

Valor del índice Kappa	Grado de concordancia
0- 0,2	Leve
0,21- 0,4	Aceptable
0,41- 0,6	Moderada
0,61- 0,8	Sustancial
0,81- 1	Casi perfecta- Perfecta

9. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el ensayo son comparados con los diferentes trabajos publicados. Si bien los antecedentes bibliográficos comparan las mismas pruebas diagnósticas, existen variaciones en los protocolos utilizados, antígenos seleccionados (serovares), diseño de los ensayos, lectura y análisis de los resultados, respecto a nuestro trabajo.

En la investigación llevada a cabo por Bourhy y col. (2013) utilizaron un test de ELISA que detectaba anticuerpos IgM. La prueba dio un valor de 94% de sensibilidad y 99% de especificidad. Este valor de especificidad fue superior al obtenido en nuestro ensayo (88%). El valor Kappa entre el MAT y ELISA determinado por estos investigadores fue de 0,92 clasificándose como un valor “casi perfecto”. Una de las diferencias respecto a nuestro trabajo radican en el serovar de leptospira utilizado como antígeno en la placa ELISA, *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge. Además, el ensayo está dirigido para anticuerpos del tipo IgM, a diferencia del kit utilizado por nosotros que es específico para IgG. La *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge es una

especie de *Leptospira* descubierta recientemente y hasta el momento solo se ha cultivado a partir de fuentes animales. Se ha descrito en dos pacientes con enfermedad de Weil de quienes se cultivó *L. fainei* (Petersen y col., 2001).

En Canadá, Surujaballi y Mallaroy (2001) desarrollaron un ELISA capaz de detectar anticuerpos de *Leptospira interrogans* serovar Pomona. En este trabajo podemos ver similitudes con nuestro ensayo, ya que ambos, detectan anticuerpos del tipo IgG. Los autores obtuvieron una sensibilidad y especificidad de 93,7% y 96,3% respectivamente. El valor de sensibilidad fue menor al calculado en nuestro trabajo. El análisis de la curva ROC de los resultados del ELISA fue combinando los diferentes grupos de sueros analizados por los autores grupo A (Pomona positivo al MAT), grupo B (Pomona negativo al MAT) y grupo C (sin títulos al MAT) con un valor para el área bajo esta curva de 0,97 lo que muestra un alto nivel de precisión. Valor aproximado al calculado en este trabajo. Una diferencia de este ensayo con respecto al nuestro, es el serovar que utilizaron en su placa ELISA, el cual fue a partir del serovar Pomona. Factor que podría explicar las diferencias en los valores de ambos trabajos.

Los mismos autores, Surujaballi y Mallaroy (2004) desarrollaron otro ELISA a partir de 6 cepas de *Leptospiras* concluyendo que la sensibilidad y la especificidad relativa del ensayo fue de 93,5% y 94,7%. Los resultados expuestos por estos autores difieren ya que el ELISA es realizado con un mix de serovares de *Leptospiras*, a diferencia del kit utilizado en el presente trabajo que está dirigido al serovar Hardjo. Sin embargo, si se compran los valores de nuestro estudio (criterio de clasificación genérico) aun así existen diferencias en la sensibilidad, siendo más elevado en el caso del kit comercial que utilizamos.

En el trabajo publicado por El Jalii (2008) se utiliza como antígeno para el ELISA el serovar Hardjo, igual al kit utilizado en nuestro ensayo; el autor concluye que el ELISA fue 100% sensible; plantea que no hubo muestras positivas al MAT que resultaran negativas en el ELISA. La sensibilidad encontrada fue similar que la encontrada en nuestro trabajo utilizando el mismo serovar. Además, El Jalii (2008) plantea que el test detecta múltiples serovares de *Leptospira* no solo Hardjo. El autor no plantea en su trabajo el cálculo de especificidad para el ELISA tampoco menciona el punto de corte que uso.

Aslantas y col. (2004), compararon los resultados del ELISA con los de MAT, obtuvieron una sensibilidad y especificidad para ELISA de 82,2%, y 94,2% los resultados de estos autores varían si se comparan con los nuestros. Para los criterios de clasificación de nuestro trabajo la sensibilidad obtenida fue mayor y la especificidad fue menor. Una de las diferencias que presenta el ensayo es que Aslantas y col. (2004) utilizaron en el ELISA como antígeno una mezcla de 4 serovares de leptospiras.

En Brasil, Bomfim y col. (2005) obtuvieron una sensibilidad y especificidad muy alta del 100% utilizando el ELISA *LipL32* realizado a partir de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. El ELISA desarrollado por los autores les permitió detectar anticuerpos IgG y fue probado también con sueros negativos al MAT. La diferencia en los valores de sensibilidad que encontraron estos autores respecto a nuestro trabajo podrían deberse a que el antígeno utilizado por ellos el cual deriva de una lipoproteína genérica de leptospiras patógenas *LipL32*. De forma similar Aragão y col. (2012)

utilizaron el mismo antígeno y protocolo de trabajo que Bomfim y col. (2005) para el desarrollo del ELISA y obtuvieron resultados similares con una alta sensibilidad y especificidad.

Tomich y col. (2007) utilizaron como antígeno para el ELISA la proteína recombinante *LipL32*, obteniendo una alta sensibilidad del 99,3% y especificidad de 86,3% valores muy similares a nuestro ensayo. Con respecto al área de la curva ROC obtuvieron un valor de 0,947. Este valor fue apenas superior al valor del área calculada que fue de 0,906. Los autores se basaron en el protocolo de Bomfim y col. (2005) que usaron extracto de proteína genérica.

Sakhaee y col. (2010) utilizaron un kit ELISA a partir de 6 serovares de *Leptospira interrogans*; es una diferencia importante con nuestro ensayo. Para el análisis de datos, usaron la índice kappa con un resultado de 0,892. Valor muy similar al resultado de nuestro trabajo.

En el estudio de prevalencia de leptospirosis realizado por Miyama y col. (2018) utilizaron un kit detectaba anticuerpos IgG en respuesta a un lipopolisacárido común a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo y *Leptospira interrogans* serovar Hardjo los autores asumieron que tenía una sensibilidad de 94,1% y una especificidad de 94,8% el valor de sensibilidad es menor con respecto a nuestro ensayo. La especificidad es menor en nuestro trabajo. Se puede mencionar una diferencia con esta publicación es que las muestras eran a partir de leche y no suero.

Bercovich y col. (1990) desarrollaron un test ELISA a partir de un sonicado de *Leptospira* serovar Hardjo. Comparando ELISA y MAT los autores demostraron que, de los 704 sueros de bovinos, el 89,5% reaccionaron de manera comparable en ambas pruebas. Los autores concluyen que hay un 90% de correlación en las técnicas. Hay similitudes con esta publicación respecto al antígeno que se utilizó en la placa de ELISA para la detección de anticuerpos. El kit comercial utilizado en este ensayo fue desarrollado en base al protocolo publicado por estos autores.

En nuestro ensayo la especificidad respecto a la mayoría de los autores previamente citados, fue menor. Para la determinación de la especificidad en nuestro ensayo se utilizaron sueros de terneros, los cuales se extrajeron previo al primer contacto con el calostro materno. Los sueros de dichos animales fueron analizados por la prueba de MAT al mismo título de corte (1:100) que el resto de las muestras (título recomendado por la OIE), de los 40 animales negativos a MAT 5 fueron reaccionantes a la prueba de ELISA. Debido a la falta de una buena prueba “Gold estándar” para esta enfermedad, con este diseño no podríamos confirmar que los animales presentaban o no anticuerpos a *Leptospiras* patógenas. Por tanto, debería de diseñarse otra estrategia de estudio para determinar dicha conclusión.

10. CONCLUSIONES

La prueba de ELISA presentó una alta sensibilidad relativa a la MAT no así si nos referimos a la especificidad. Sin embargo, el índice Kappa demostró una muy buena concordancia entre las pruebas.

La prueba de ELISA indirecto es una alternativa ventajosa respecto al MAT para el diagnóstico de leptospirosis en ganado bovino ya que no es necesario utilizar un panel de leptospiras vivas y la lectura de la prueba es objetiva. Sin embargo, mediante este ensayo se pudo determinar que el ELISA elegido para ser evaluado no diagnostica únicamente la serovar Hardjo como específica el proveedor. Determinándose que la técnica de ELISA cruza con otras serovariedades como ser Pomona, Wolffi y Grippotyphosa.

Si bien la serovar Hardjo es endémica en nuestros rodeos existen otras serovares (Zarantonelli y *col.*, 2018) las cuales también están presentes y son causas de problemas reproductivos en nuestro rodeo. En este escenario epidemiológico este kit de ELISA no ofrecería ventajas respecto a las pruebas que hoy tenemos disponibles. Si bien los resultados del presente trabajo son un muy buen antecedente deberían de realizarse más investigaciones en procura de un ELISA que pueda ser una buena alternativa a la prueba de MAT.

11. Bibliografía

- 1) Adler B., de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4): 287-296.
- 2) Alder B. (2015) *Leptospira and leptospirosis*. 387. Melbourne, Springer, 293p.
- 3) Aragão, F. J. M., Rodrigues, H. W. S., Vieira, R. J., Alves, R. P. A., Vieira, A. F., Mineiro, A. L. B. B. (2012). Evaluation and comparison of the reactions of microscopic agglutination test and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA IgG) with the recombinant LipL32 in the diagnosis of bovine leptospirosis. *Ciência Animal*, 22(Sup 1): 131-133.
- 4) Aslantaş, Ö., Özdemir, V. (2005). Determination of the seroprevalence of leptospirosis in cattle by MAT and ELISA in Hatay, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(4): 1019-1024.
- 5) Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. (2003) Evaluation of commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol*, 41: 803–809.
- 6) Baranton G, Old IG. (1995) The spirochaetes: a different way of life. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 93: 63-95.
- 7) Bercovich, R. Taaijke, Bokhout B.A. (1990) Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infection in cattle. *Veterinary Microbiol*, 21: 255-262.
- 8) Bolin, C. A. (2003). Diagnosis and control of bovine leptospirosis. *Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference Reno, USA* p.155-60.
- 9) Bomfim, M. R. Q., Ko, A., Koury, M. C. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 109(1-2): 89-94.
- 10) Bourhy, P., Vray, M., Picardeau, M. (2013). Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 62(6): 822-827.
- 11) Brihuega, B. (2008). Leptospirosis: diagnóstico y tipificación. *Temas de Zoonosis IV. Asociación Argentina de Zoonosis*, 221-7. Disponible en: helminto.inta.gob.ar Fecha de consulta :02/04/2018

- 12) Brihuega, B. (2013). Importancia de la leptospirosis en el sector ganadero y en la salud pública en Argentina. Disponible en: sedici.unlp.edu.ar Fecha de consulta: 30/3/2019
- 13) Caffarena, R. M., Cacchione, R. A., Cascelli, E. S., Martínez, E. S. (1971). Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol*, 9: 186-94.
- 14) Canal, E., Pollett, S., Heitzinger, K., Gregory, M., Kasper, M., Halsey, E., Meza, Y., Campos, K., Perez, J., Meza, R., Bernal, M., Guillen, A., Kochel, T.J., Espinosa, B., Hall, E.R., Maves, R.C., (2013). Detection of human leptospirosis as a cause of acute fever by capture ELISA using a *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (M20) derived antigen. *BMC Infect. Dis.* 13: 438.
- 15) Chen, H.W., Zhang, Z., Halsey, E.S., Guevara, C., Canal, E., Hall, E., Maves, R., Tilley, D.H., Kochel, T.J., Ching, W.M., (2013). Detection of *Leptospira*-specific antibodies using a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Am.j. Trop. Med. Hyg.* 89: 1088–1094.
- 16) Cortizo, P., Loureiro, A. P., Martins, G., Do Rodrigues, P. R., Faria, B. P., Lilenbaum, W., Deminicis, B. B. (2015). Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47 (1): 231-235.
- 17) Cousins, D. V., Robertson, G. M., Hustas, L. (1985). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle. *Veterinary Microbiology*, 10 (5): 439-450.
- 18) Cumberland, P., Everard, C. O., Levett, P. N. (1999). Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5): 731-734.
- 19) Dupouey, J., Faucher, B., Edouard, S., Richet, H., Kodjo, A., Drancourt, M., Davoust, B. (2014). Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2): 77-83.
- 20) Dreyfus, A. (2013). *Leptospirosis in Humans and Pastoral Livestock in New Zealand: Tesis Massey University*, 236p.
- 21) Easton, C., Paullier, C., Bañales, P. (2003). Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE “Miguel C. Rubino”, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 38: 25-30.

- 22) El Jalii, I. M. (2008). Comparism between ELISA and the microscopic agglutination test for the diagnosis of bovine leptospirosis. *Revue d'Elevage Medecine Veterinaire Pays Tropicaux*, 61: 73-75.
- 23) Ellis, W. A., O'brien, J. J., Neill, S. D., Bryson, D. G. (1986). Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Veterinary Microbiology*, 11(3): 293-299.
- 24) Ellis W.A. (2015) Animal Leptospirosis. En: Adler B. (eds) *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin Springer, vol 387 :99-125
- 25) Espi, A., Prieto, J. M., Fernandez, M., Alvarez, M. (2000). Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). *Epidemiology & Infection*, 124(3): 599-602.
- 26) Ertas, H. B., Çetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H., Özdemir, V., Yazicioglu, N. (2002). Determination of the Seroprevalence of *Leptospira* in Cattle by MAT and ELISA. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(6):1415-1420.
- 27) Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (1999) *Leptospira and Leptospirosis*. 2a ed. Melbourne, MediSci, p. 90-180.
- 28) Fang, F., Collins-Emerson, J. M., Cullum, A., Heuer, C., Wilson, P. R., Benschop, J. (2014). Shedding and seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep and cattle at a New Zealand abattoir. *Zoonoses and Public Health*, 62(4): 258-268.
- 29) Genovez, M. E., Escócio, C., Castro, V., Gabriel, F. H. L., Chiebao, D. P., Azevedo, S. S. (2011). Fatores de risco associados à infecção pela leptospira spp. Serovar hardjo em rebanhos exclusivos de ovinos e nos consorciados com bovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78(4): 587-592.
- 30) Gerritsen, M. J., Olyhoek, T., Smits, M. A., Bokhout, B. A. (1991). Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12): 2805-2808.
- 31) Gil A., Samaritano L. (2001) Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de America Latina. *Livestock Policy Discussion PaperNo.2FoodandAgriculture*. Disponible en: www.fao.org/ag/againfo/resources/es/publications/sector_discuss/PP_Nr2_Final.pdf Fecha de consulta: 01/11/2016.
- 32) Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A. P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Veterinary Research Communications*, 38(1): 81-85.

- 33) Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M., Ellis, W. A. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4): 494-501.
- 34) Lage, A. P., de M H, L. (2007). Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 74(3): 185-190.
- 35) Levett, P.N., (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 296–326.
- 36) Levett, P.N., (2003). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 36: 447–452.
- 37) Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., Turner, D. E., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 54(1): 45-49.
- 38) Lilenbaum, W., Martins, G. (2014). Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and emerging diseases*, 61: 63-68.
- 39) Limmathurotsakul, D., Turner, E. L., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J., Suputtamongkol, Y., Chierakul, W., Peacock, S. J. (2012). Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clinical infectious diseases*, 55(3): 322-331.
- 40) Loureiro, A. P., Martins, G., Thomé, S., Lilenbaum, W. (2013). Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 20(3): 119-126.
- 41) Manual de instrucciones de uso kit ELISA PRIOCHECK Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/.../MAN0013805_7442080_UG_es.p Fecha de consulta :12/03/2018.
- 42) Mariya, R., Chaudhary, P., Kumar, A. A., Thangapandian, E., Amutha, R., Srivastava, S. K. (2006). Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29(5-6): 269-277.
- 43) Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V., Kodjo, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *International Microbiology*, 20(4): 184-193.
- 44) Mineiro, A. L. B. B., Vieira, R. J., Costa, É. A., Santos, R. L., Gonçalves, L. M. F., Carvalho, S. M., Costa, F. A. L. (2011). Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy

cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(10): 859–866.

- 45) Moles Cervantes, L. P., Cisneros Puebla, M. Á., Gavaldón Rosas, D., Rojas Serranía, N., Torres Barranca, J. I. (2002). Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(1): 24-27.
- 46) Murray, G. L., Srikrum, A., Hoke, D. E., Wunder, E. A., Henry, R., Lo, M., Adler, B. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, 77(3): 952-958.
- 47) Musso, D., La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(4): 245-252.
- 48) Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., Urushiyama, Y., Kawahara, N., Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Leptospira Hardjo* infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 149: 15-20.
- 49) Nally, J. E., Chantranuwat, C., Wu, X. Y., Fishbein, M. C., Pereira, M. M., Da Siva, J. J. P., Lovett, M. A. (2004). Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *The American Journal of Pathology*, 164(3): 1115-1127.
- 50) Nascimento, A. L. T. O., Ko, A. I., Martins, E. A. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Ho, P. L., Haake, D. A., Menck, C. F. M. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 186(7): 2164-2172.
- 51) OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6^a ed. World Organisation for Animal Health, Paris, (2008). Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D12009.PDF> Fecha de consulta: 20/09/2018.
- 52) Oliveira, F., Azevedo, S. S., Pinheiro, S. R., Batista, C. S., Moraes, Z. M., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A. (2010). Risk factors associated with leptospirosis in cows in the state of Bahia, northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 30(5): 398-402.
- 53) OPS/OMS - ILS (2008) Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control Disponible en: www.anlis.gov.ar/iner/wp-content/uploads/2013/11/Manual-final2.pdf Fecha de consulta: 01/07/2018.
- 54) Penna, B., Marassi, C. D., Libonati, H., Narduche, L., Lilenbaum, W., Bourhy, P. (2017). Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* as antigen for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50: 13-15.

- 55) Petersen, A. M., Boye, K., Blom, J., Schlichting, P., Krogfelt, K. A. (2001). First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome. *Journal of Medical Microbiology*, 50(1): 96-100.
- 56) Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 43(1): 1-9.
- 57) Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B., Lilenbaum, W. (2015). Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trópica*, 149:163-167.
- 58) Pimenta, C. L., Castro, V., Clementino, I. J., Alves, C. J., Fernandes, L. G., Brasil, A. W., Azevedo, S. S. (2014). Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(4): 332-336.
- 59) Radostits OM., Blood DC (2002) *Medicina Veterinaria Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, y equino*. 9a ed, Madrid, Mac Gaw- Hill, V.1, p.1151-1168.
- 60) Repisso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005) Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria*, (Montevideo), 40(157): 5-28.
- 61) Rocha de Almeida Paim, E., Zago Ciuffa, A., Olímpia Gomes, D., Rezende, L. M., Mundim Silva, D., Cabral Pires, B., Monteiro Correia Lima, A. (2016). Seroepidemiology of leptospirosis in dairy cattle in Ipameri, state of Goiás, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(4):1937-1946.
- 62) Sakhaee, E., Abdollahpour, G., Bolourchi, M., Tabrizi, S. S. (2010). Comparison between microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of leptospiral antibodies in cattle. *Comparative Clinical Pathology*, 19(1): 5-9.
- 63) Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G., Boqvist, S. (2014). A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*, 10(1): 126.
- 64) Schlichting D., Nöckler K., Bahn P., Luge E., Greiner M., Müller-Graf C., Mayer-Scholl A. (2015) Estimation of the sensitivity and specificity of a *Leptospira* spp.in-house ELISA through Bayesian modelling *International Journal of Medical Microbiology* 305(7): 756-761.

- 65) Suanes, A. (2013) Leptospirosis bovina: Enfermedad, Epidemiología y Diagnóstico serológico. En: Publicación Académica "Leptospirosis". Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. p:18-25. Disponible en:
<http://www.academiadeveterinaria.uy/wpcontent/uploads/2017/03/Leptospirosis.pdf> Fecha de consulta :01/06/2019
- 66) Surujballi, O.P., Marenger, R.M., Eaglesome, M.D., Sugden, E.A., (1997a). Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.* 61: 260-266.
- 67) Surujballi, O.P., Henning, D., Marenger, R.M., (1997b). Howlett, Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type Hardjobovis antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.* 61: 267-274.
- 68) Surujballi, O., Mallory, M. (2001). Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Leptospira interrogans* Serovar pomona Antibodies in Bovine Sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(1): 40-43.
- 69) Surujballi, O., Mallory, M. (2004). An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68(1):1-6.
- 70) Terpstra, W. J., Ligthart, G. S., Schoone, G. J. (1985). ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *Microbiology*, 131(2): 377-385.
- 71) Tomich, Renata Graça Pinto, Bomfim, Maria Rosa Quaresma, Koury, Matilde Cota, Pellegrin, Aiesca Oliveira, Pellegrin, Luiz Alberto, Ko, Albert Icksang, Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo. (2007). Leptospirosis serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using IGG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4): 674-680.
- 72) Van Eys, G. J., Gravekamp, C., Gerritsen, M. J., Quint, W., Cornelissen, M. T., Schegget, J. T., Terpstra, W. J. (1989). Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(10) :2258-2262.
- 73) Vedhagiri, K., Velineni, S., Timoney, J.F., Shanmughapriya, S., Vijayachari, P., Narayanan, R., Natarajaseenivasan, K. (2013) Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. *Pathog. Glob. Health* 107: 130–135
- 74) Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N., (2008). Leptospirosis: an emergin global public health problem. *J. Biosci.* 33: 557–569.

- 75) Wang, B. O. Y. A. O., Sullivan, J. A., Sullivan, G. W., Mandell, G. L. (1984). Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity*, 46(3): 809-813.
- 76) Wolf, J.W. Springfield, IL, Charles C. Thomas, (1954). The laboratory diagnosis of leptospirosis. Disponible en: <http://www.who.int/topics/leptospirosis/en/>
Fecha de consulta: 13/03/2018.
- 77) Yan, K. T., Ellis, W. A., Mackie, D. P., Taylor, M. J., McDowell, S. W. J., Montgomery, J. M. (1999). Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Veterinary Microbiology*, 69(3): 173-187.
- 78) Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Easton, C. (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 neglected tropical diseases*, 12(9), e0006694.