



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE PRUEBAS
DIAGNÓSTICAS SEROLÓGICAS, BACTERIOLÓGICAS Y
MOLECULARES APLICADAS EN PREDIOS CON
SINTOMATOLOGÍA COMPATIBLE CON LEPTOSPIROSIS
BOVINA**

FLORENCIA BURONI ZENI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2018



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE PRUEBAS
DIAGNÓSTICAS SEROLÓGICAS, BACTERIOLÓGICAS Y
MOLECULARES APLICADAS EN PREDIOS CON SINTOMATOLOGÍA
COMPATIBLE CON LEPTOSPIROSIS BOVINA**

FLORENCIA BURONI ZENI

Dr. MSc Rodolfo Rivero
Director de Tesis

Dra. MSc Alejandra Suanes
Co-directora

Dra. Leticia Zarantonelli
Co-directora

2018

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Andrés Gil; MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay

Camila Hamond; PhD en Medicina Veterinaria (Clínica y Reproducción Animal)
Unidad Mixta Pasteur + INIA, Institut Pasteur de Montevideo / Instituto Nacional de
Investigación Agropecuaria INIA- Uruguay

Dr. Fernando Paolicchi MS
Responsable de Laboratorio de Bacteriología Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria, Balcarce, Argentina Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad de
Mar del Plata, Argentina.

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

Estudio del comportamiento de pruebas diagnósticas serológicas, bacteriológicas y moleculares, aplicadas en predios con sintomatología compatible con Leptospirosis bovina

Por: Dra. Florencia BURONI ZENI

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Rivero

Codirectoras de Tesis: Dra. Alejandra Suanes

Dra. Leticia Zarantonelli

Tribunal

Presidente: Dr. Andrés Gil

Segundo Miembro: Dr. Fernando Paolicchi

Tercer Miembro: Dra. Camila Hamond

Fallo del Tribunal: APROBADA

Salón de Posgrados
Lunes 18 de junio de 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por el apoyo financiero al proyecto de investigación y a mi formación académica proporcionándome la beca para poder realizar la Maestría en Salud Animal.

A los proyectos Alianza ANII ALI_1_2014_1_4982, “Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira* spp aisladas de casos de leptospirosis bovina en Uruguay”, y ANII-INNOVAGRO FSA_1_2013_1_12557, “Tipificación y diagnóstico de *Leptospira* pp. por técnicas moleculares: hacia el diseño de vacunas recombinantes”, que permitieron la financiación y desarrollo de los trabajos de investigación.

A la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, a su director Dr. Álvaro Núñez, por todo el soporte institucional prestado al desarrollo de las diferentes actividades.

Al Departamento de Bacteriología y al Servicio de Leptospirosis de la DILAVE, a Alejandra, Ximena, Alberto, Gimena, Natalia y Valentina, por sus conocimientos transmitidos y colaboración incondicional en la ejecución de las técnicas serológicas y bacteriológicas así como también en los muestreos de campo, siendo para mí un fuerte sostén en toda esta etapa de desarrollo.

Al Institut Pasteur de Montevideo, en especial al Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural y al Laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI), a Alejandro y Leticia, por sus conocimientos brindados y colaboración para la ejecución de las técnicas moleculares, sus consejos y permanente apoyo. A Cecilia, por su compañía y transmisión de conocimientos en tantas tardes de procesamiento de materiales.

A la DILAVE Regional Noroeste de Paysandú, por permitirme desarrollar el presente trabajo de investigación, por brindarme materiales y equipamiento necesarios. A todos sus técnicos, funcionarios y pasantes, Rodolfo, Edgardo, Adriana, Carolina, Marcelo, Rosina, Víctor, Marcos, Pablo, Ana, Lucía, Gimena y Cinthya, por el compañerismo, amistad y apoyo en las diferentes actividades que involucraron el presente trabajo. Muchas gracias por el estímulo permanente y por hacerme sentir como en casa.

A la DILAVE Este de Treinta y Tres, por su colaboración en el muestreo de campo.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, por permitirme continuar mi formación profesional y desarrollar mis estudios de posgrado.

A los funcionarios de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por su disposición y rápida respuesta en cada solicitud bibliográfica.

A los veterinarios particulares y productores de los diferentes establecimientos agropecuarios, por brindarme su apoyo técnico y abrirnos las puertas para el desarrollo de los muestreos de campo.

A los docentes y estudiantes del Orientado de Producción Animal Norte de la Facultad de Veterinaria la Udelar de los años 2015, 2016 y 2017, por su apoyo académico en mi formación y colaboración en los muestreos de campo.

A mi tutor Rodolfo “Chivo” Rivero, por confiar en mí para la realización de este trabajo de investigación y por impulsarme siempre a continuar mi formación, por brindarme sus conocimientos tanto académicos como personales y por despertar el interés por la investigación.

A mis co-tutoras Alejandra Suanes y Leticia Zarantonelli, en primera instancia por aceptarme como estudiante de maestría conociéndome muy poco, por formarme cada una en su área de trabajo con paciencia, por transmitirme sus conocimientos y por impulsarme a continuar mi formación.

A Marcelo, por su voluntad y compañía en los muestreos de campo desde el inicio al fin, por la paciencia en tantos kilómetros recorridos.

A Agustina, a Andrés y a Simón, por abrirme siempre las puertas de su casa en Montevideo y por recibirme con alegría en tantas oportunidades.

A mi familia, por estar siempre presente y apoyarme en los diferentes proyectos de vida, especialmente a Mamá por su amor incondicional.

A Aarón, por su apoyo, paciencia y compañerismo en esta etapa, por sus palabras de aliento en los momentos en que la meta se hacía cuesta arriba.

ÍNDICE

Resumen	v
Summary	vi
1. Introducción	1
1.1. Características del agente	1
1.2. Epidemiología de la enfermedad	2
1.3. Patogenia	3
1.4. La enfermedad en bovinos	4
1.5. La enfermedad en humanos	5
1.6. Diagnóstico de leptospirosis	5
1.6.1. Métodos indirectos	6
1.6.2. Métodos directos	8
1.7. Tratamiento y control de la leptospirosis	9
2. Antecedentes específicos	10
2.1. Leptospirosis bovina: antecedentes internacionales.....	10
2.2. Antecedentes nacionales	11
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivo general	13
6. Objetivos específicos	13
7. Materiales y métodos	14
7.1. Elección de los predios a incluir en el muestreo	14
7.2. Obtención de las muestras	14
7.3. Procesamiento de muestras	15
7.3.1. Serología por MAT	15
7.3.2. Detección de ADN de especies patógenas de <i>Leptospira</i> mediante amplificación por PCR del gen <i>lipL32</i>	16
7.3.3. Cultivo y aislamiento	17
7.3.4. Análisis estadístico	18
8. Resultados	18
8.1. Descripción de los predios estudiados	18
8.2. Aplicación de MAT en suero de bovinos muestreados en campo	20
8.3. Detección de <i>Leptospira</i> spp. en muestras de orina y plasma colectadas de bovinos a campo mediante amplificación del gen <i>lipL32</i>	22
8.4. Cultivo y aislamiento de <i>Leptospira</i> spp. a partir de orina y de sangre de bovinos a campo	23

8.5. Estudio de correlación entre las distintas metodologías aplicadas	26
9. Discusión	33
10. Conclusiones	37
11. Referencias bibliográficas	38
12. Anexo I	47
13. Anexo II	48
14. Anexo III	49
15. Anexo IV	51

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial que es causada por distintas especies patógenas del género *Leptospira*. En Uruguay, el diagnóstico en animales durante muchos años estuvo basado en la técnica serológica de aglutinación microscópica (MAT). El objetivo del presente estudio fue establecer el acuerdo entre la técnica serológica, el cultivo microbiológico y el método molecular de amplificación del gen *lipL32* por PCR en muestras provenientes de rodeos con sintomatología clínica compatible con leptospirosis bovina. Se recolectaron muestras de 44 establecimientos pertenecientes a 13 departamentos del Uruguay, los que comprendían tanto sistemas lecheros como carniceros. Se extrajeron 860 muestras de suero y orina; las primeras fueron analizadas por MAT y las segundas fueron inoculadas en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con 5-fluorouracilo (5-FU) en campo y analizadas por PCR. El 95 % de los establecimientos (42/44) y 39 % de los animales (339/860) fueron reactivos al MAT con título ≥ 200 . El 19 % de las orinas (167/884) fueron positivas por PCR y se obtuvieron 33 cultivos positivos para especies patógenas de *Leptospira*. Finalmente, se lograron purificar y obtener 25 aislamientos que fueron identificados mediante la combinación de métodos serológicos y moleculares, que dieron como resultado 19 aislamientos de *L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki, 2 de *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo y 4 de *L. noguchii* serogrupos Autumnalis (n=2), Australis (n=1) y Pyrogenes (n=1). Se estudió la concordancia entre los diferentes métodos y los valores de Kappa indicaron que existe concordancia leve a aceptable entre el método indirecto y los directos (k= 0,26 entre MAT y PCR y k= 0,08 entre MAT y cultivo) y leve entre los métodos directos (k= 0,16 entre PCR y cultivo). Las pruebas diagnósticas reflejaron poseer diferentes ventajas, por lo que se considera que las tres herramientas deben ser aplicadas en Uruguay tanto con fines diagnósticos como en investigaciones epidemiológicas.

SUMMARY

Leptospirosis is a zoonosis widely distributed worldwide caused by different pathogenic species of the *Leptospira* genus. The diagnosis of leptospirosis in Uruguay is based on a serologic method, the microscopic agglutination test (MAT). The aim of the present study was to establish the agreement between the serological techniques, the microbiological culture and the molecular method of amplification of the *lipL32* gene by PCR in samples that were obtained from herds with symptomatology compatible with bovine leptospirosis. Samples were collected from 44 farms, including both dairy as well as beef systems, and belonging to 13 departments of Uruguay.. Eight hundred and sixty urine and serum samples were extracted. The serum samples were analyzed by MAT and the urine samples were inoculated in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) media with 5-fluorouracil (5-FU) in the field and analyzed by PCR. The 95% of the establishments (42/44) and 39% of the animals (339/860) were reactive to MAT with titre ≥ 200 . The 19% of the urines (167/860) were positive to PCR and 33 cultures positive to pathogenic *Leptospira* species were obtained. Lastly, it was achieved the purification and obtaining of 25 isolates that were identified by the combination of serological and molecular methods resulting in 19 isolates of *L. interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki, 2 of *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Hardjo and 4 of *L. noguchii* serogroup Autumnalis (n=2), Australis (n=1) y Pyrogenes (n=1). The concordance between the different methods and the Kappa values was studied, indicating that there is a slight to acceptable agreement between the indirect and direct method ($k = 0.18$ between MAT and PCR and $k = 0.05$ between MAT and culture) and slight between the methods direct ($k = 0.16$ between PCR and culture). The different diagnostic tests reflected having different advantages; consequently it is considered that the three tools must be applied in Uruguay for diagnostic purposes as well as in epidemiologic research.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características del agente

La leptospirosis es la zoonosis de más amplia distribución a nivel mundial, pues se trata de una enfermedad bacteriana infecto-contagiosa causada por distintas especies patógenas del género *Leptospira*, que afecta a todas las especies de mamíferos (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

El género *Leptospira* pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae*, cuyos miembros son bacterias en forma de espiral de 0,1 µm de diámetro por 6-20 µm de longitud, con extremos en forma de gancho y flagelo interno; dichas bacterias presentan un órgano locomotor que les brinda gran movilidad (Faine et al. 1999; Picardaeu, 2013; Cameron, 2015). La estructura general de *Leptospira* spp. es similar a la de las bacterias Gram negativas, con una membrana externa, una membrana interna y un espacio periplasmático intermedio que contiene peptidoglicano; la membrana externa esta recubierta por el lipopolisacárido (LPS) de superficie (Cameron, 2015).

Antiguamente, el género *Leptospira* se dividía en dos especies: *L. interrogans*, que comprendía a los serovares patógenos, y *L. biflexa*, en donde se encontraban los serovares saprófitos aislados del medio ambiente (Levett, 2001). En la actualidad y en base a estudios genómicos, se identificaron 22 especies diferentes dentro del género *Leptospira*. Esta clasificación incluye 6 especies saprófitas que son cepas ambientales no patógenas (*L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*), 10 especies patógenas que han sido aisladas de animales y/o humanos (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. mayottensis*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi*) y 6 especies intermedias (*L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. venezuelensis*) que, si bien se han aislado de humanos y/o animales, no se ha demostrado experimentalmente su virulencia en modelos animales de laboratorio (Picardaeu, 2013; Fouts et al. 2016, Puche et al. 2017). Recientemente, Thibeaux et al. (2018) identificaron nuevos genomas que se podrían corresponder con nuevas especies del género *Leptospira*.

Existe, asimismo, una clasificación fenotípica y serológica para las bacterias de este género que se basa en la estructura antigénica del LPS de superficie y que permite agrupar a las leptospiras en serovares (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). A su vez, la mayoría de los serovares patógenos se hallan en las tres especies con distribución mundial: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri*. Existen más de 300 serovares distintos de leptospiras reconocidos, que se agrupan en 25 serogrupos (Picardeau, 2013). Es importante recordar que un serogrupo se define como un conjunto de serovariedades que comparten similitud en el antígeno O del LPS de superficie. Los diferentes serovares se identifican por medio de pruebas de aglutinación cruzada con sueros hiperinmunes específicos de conejo (Faine et al.

1999). La capa que corresponde al LPS posee un espesor diferencial entre las especies de leptospiras patógenas y saprófitas: así, *L. interrogans* posee un espesor que se extiende 9,2 nm desde la membrana externa, mientras que *L. biflexa* cuenta con una capa de LPS más delgada, de 6,0 nm (Cameron, 2015).

Las leptospiras patógenas muestran un crecimiento óptimo *in vitro* a 28-30 °C, en un rango de pH de 7,2 a 7,6. El crecimiento se puede visualizar a través de microscopía de campo oscuro (MCO), al tiempo que se realiza el conteo de las mismas en una cámara de recuento de Petroff-Hausser (Cameron, 2015).

1.2. Epidemiología de la enfermedad

La leptospirosis es una enfermedad endémica en muchos países, aunque a menudo presenta brotes epidémicos que causan enfermedades graves y a veces fatales, tanto en humanos como en animales. La morbilidad anual debida a la leptospirosis en humanos en todo el mundo se estimó en 14,77 casos por 100.000 habitantes y la mortalidad en 0,84 muertes por 100.000 habitantes (Costa et al. 2015). La incidencia media global de leptospirosis humana en zonas endémicas fue de 5 casos por 100.000 habitantes, llegando incluso a 975 casos por 100.000 habitantes en algunas zonas (WHO, 2011). Asimismo, el más alto índice de morbilidad se concentró en hombres entre 20 y 29 años de edad, mientras que la mortalidad más alta estimada también se registró en hombres, pero entre 50 y 59 años de edad (Costa et al. 2015).

Por otra parte, la leptospirosis presenta una nidalidad natural y cada serovar tiende a permanecer en hospedadores de mantenimiento específicos; de todas maneras, cualquier leptospira patógena podría infectar a cualquier especie animal. En cualquier región una especie animal doméstica resultará infectada tanto por serovares adaptados a esa especie o por serovares adaptados a otras especies de animales presentes en la zona. La importancia relativa de estas infecciones incidentales se determina en función de la probabilidad de que factores sociales, de manejo y ambientales predominantes faciliten el contacto y la transmisión de leptospiras a partir de otras especies (Hathaway, 1981; Manual Terrestre de la OIE, 2014; Ellis, 2015).

En animales, las leptospiras adaptadas al huésped causan poco efecto clínico y daños patológicos mínimos en sus huéspedes, excepto en animales inmunodeprimidos, hembras preñadas, neonatos o en animales con infecciones concurrentes, tales como diarrea viral bovina en el ganado (Ellis, 2015). El diagnóstico de las infecciones por serovares adaptados al huésped es a menudo difícil debido a una respuesta de anticuerpos relativamente baja contra el serovar infectante y la presencia de pocos microorganismos en los tejidos de los animales infectados (Bolin, 2000). Además, las principales infecciones de huésped de mantenimiento incluyen *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis y *L. interrogans* serovar Hardjoprajitno en bovinos, *L. interrogans* serovar Pomona en cerdos, *L. interrogans*

serovar Copenhageni en ratas y *L. interrogans* serovar Canicola en perros (Grooms, 2006; Mackintosh, 2014). Sin embargo, en la actualidad fueron reportados aislamientos de *L. santarosai*, *L. alstonii* y *L. interrogans* de bovinos clínicamente sanos en plantas de faena, lo que plantea un nuevo paradigma de adaptabilidad de otras especies de *Leptospira* en el bovino (Pinto et al. 2017).

Las infecciones incidentales, causadas por especies patógenas de *Leptospira* no adaptadas al huésped, son más comunes en climas cálidos y húmedos, con malas condiciones sanitarias y sistemas mixtos de animales domésticos, donde se presentan las condiciones para la contaminación ambiental por una amplia gama de cepas de *Leptospira*. Estas infecciones se caracterizan por presentar alta patogenicidad para el huésped, por estar asociadas más comúnmente con una enfermedad clínica aguda y por la excreción urinaria, que suele ser limitada (Bolin, 2000; Ellis, 2015). El diagnóstico es menos problemático debido a una marcada respuesta de los anticuerpos a la infección y a la presencia de un gran número de microorganismos en los tejidos de animales infectados (Bolin, 2000). El hombre es huésped accidental para la mayoría de los serovares patógenos (Mackintosh, 2014; Haake & Levett, 2015).

1.3. Patogenia

La infección de los animales susceptibles tiene lugar con mayor frecuencia a través de las membranas mucosas de los ojos, la boca, la nariz, el tracto genital y la piel dañada o reblandecida por el agua (Ellis, 1994; Ellis, 2015), e incluso por transmisión vertical (Lilenbaum et al. 2008; Ellis, 2015).

Una vez sorteadas las barreras de entrada, las leptospiras se multiplican en la sangre por un período de 4 a 10 días. Dicho período comienza con la fase de bacteriemia, que puede durar una semana (Ellis, 1994) y en la que las leptospiras entran y se replican en diversos tejidos, incluyendo el hígado, los riñones, los pulmones, el tracto genital y el sistema nervioso central; cuando esto ocurre, se manifiestan signos clínicos de leptospiriosis aguda que varían según el serovar y el huésped afectado (Bolin, 2000). La fase de bacteriemia culmina con la aparición de anticuerpos circulantes detectables usualmente luego de 10 a 14 días (Ellis, 1994). Tras el período de leptospiremia las leptospiras se localizan en los túbulos renales proximales, donde se multiplican y eliminan por la orina, y en el útero gestante, hecho que puede ocasionar el aborto o la muerte fetal (Smith et al. 1994; Ellis, 2015). En animales infectados por serovares adaptados al huésped, la persistencia renal y excreción urinaria intermitente pueden durar años, constituyéndose en un elemento clave en la transmisión de la leptospiriosis (Smith et al. 1994; Mackintosh, 2014). En bovinos, por ejemplo, en infecciones por el serovar Hardjo la intensidad de la excreción urinaria del microorganismo es mayor durante las primeras 4 a 6 semanas pos infección; luego, la leptospiruria es intermitente, de baja intensidad y puede persistir durante toda la vida (Ellis, 1994). Estos animales son responsables de la

perpetuación y diseminación de la bacteria hacia el ambiente y hacia otros huéspedes susceptibles (Mackintosh, 2014; Ellis, 2015).

1.4. La enfermedad en bovinos

En bovinos pueden ocurrir tres formas clínicas: aguda, subaguda o crónica. Los animales jóvenes son los más susceptibles a la leptospirosis aguda (Ellis, 2015), que se manifiesta a través de septicemia, fiebre (40,5-41,5°C), anorexia, petequias en mucosas, apatía y anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria, ictericia y palidez de mucosas (Radostits et al. 2002; Ellis, 2015). En el ganado adulto puede producirse aborto en la fase aguda de la enfermedad debido a la reacción sistémica, mientras que en vacas lactantes puede ocurrir el síndrome de caída de la producción de leche, que se caracteriza por una disminución repentina en la producción y por una ubre flácida sin calor ni dolor. A ello se le puede agregar un aumento de la temperatura corporal, leche de apariencia amarilla similar al calostro conteniendo coágulos sanguíneos, un alto recuento de células somáticas y un estado libre de microorganismos comunes que causan mastitis (Radostits et al. 2002; Ellis, 2015). Por su parte, la forma subaguda difiere de la forma aguda únicamente en el grado de los síntomas clínicos: el aborto ocurre de 3 a 4 semanas después de la infección y la ubre no manifiesta cambios físicos aparentes (Radostits et al. 2002). Finalmente, la forma crónica puede manifestarse con aborto, muerte fetal, nacimiento de terneros débiles con partos prematuros e infertilidad (Ellis, 1986; Ellis, 2015).

En la infección por el serovar Hardjo pueden ocurrir abortos, mortinatos o el nacimiento de terneros débiles, por lo general cuando una vaca es infectada por primera vez durante la preñez. Los terneros pueden nacer infectados pero aparentemente sanos y los abortos provocados por la infección a causa del serovar Hardjo tienden a ocurrir esporádicamente en comparación con las “tormentas” de aborto, que resultan de la infección con los serovares Pomona o Grippotyphosa (Bolin, 2003). En las infecciones incidentales el aborto tiene lugar de 4 a 6 semanas después de la enfermedad aguda, pero en infección por el serovar Hardjo el intervalo puede ser de entre 6 y 12 semanas, seguido por la retención de membranas fetales (Faine et al. 1999; Ellis, 2015).

La enfermedad grave es poco frecuente y suele estar asociada con la infección por cepas pertenecientes a los serogrupos Pomona, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa (Ellis, 2015). También se ha detectado mediante aislamiento bacteriano la presencia de los serogrupos Panama y Autumnalis en bovinos, ambos serogrupos asociados a enfermedad incidental (Martins et al. 2014). En bovinos, las principales causas de pérdidas económicas por leptospirosis son el aborto, la muerte fetal, el parto prematuro, el nacimiento de terneros débiles, la reducción de peso al nacer, la muerte de animales, la pérdida de producción de leche y los costos indirectos de tratamiento (Ellis, 1994; Bolin, 2000; Ellis, 2015).

1.5. La enfermedad en humanos

La leptospirosis es una zoonosis extendida y potencialmente fatal, endémica en muchas regiones tropicales; causa grandes epidemias luego de fuertes lluvias e inundaciones (Haake & Levett, 2015). La fuente de infección para los seres humanos suele ser el contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados (Levett, 2001), aunque muchos animales silvestres y domésticos pueden ser reservorios de leptospiras patógenas, como la rata marrón (*Rattus norvegicus*), que es considerada la fuente más importante de infecciones en humanos (Haake & Levett, 2015). La leptospirosis típicamente se presenta como una enfermedad febril aguda no específica, caracterizada por fiebre, mialgia y dolor de cabeza; se la puede confundir con la gripe y el dengue (Haake & Levett, 2015). La enfermedad suele ser un problema ocupacional relacionado a actividades rurales como la ganadería y la agricultura, y en ámbitos urbanos y suburbanos con trabajadores de frigoríficos, recolectores o clasificadores de residuos urbanos (Rosa, 2013).

Desde su reemergencia en el año 1998, la leptospirosis es de notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia (Schelotto et al. 2012; Rosa, 2013). En Uruguay, la leptospirosis humana se comporta como una enfermedad endémica con la ocurrencia de pequeños brotes epidémicos, ocasionales y vinculados a la actividad rural (Rosa, 2013). En el período comprendido entre los años 2001 y 2010 ocurrieron de 90 a 100 casos confirmados por año, estimando una incidencia anual de 15 infecciones por 100.000 habitantes (Schelotto et al. 2012). Las mayores tasas corresponden a zonas de producción lechera, y se ven afectados particularmente los trabajadores de tambo, con mayor proporción de casos en hombres en etapa laboral activa, entre 20 y 40 años de edad (Schelotto et al. 2013).

1.6. Diagnóstico de leptospirosis

El diagnóstico es necesario para la confirmación de la leptospirosis como una causa de enfermedad clínica, así como por otras razones, tales como la vigilancia de un rodeo, los estudios epidemiológicos o el requisito para el comercio internacional o para la introducción de animales en un establecimiento. Si bien es posible realizar un diagnóstico presuntivo de leptospirosis en casos en los que la enfermedad clínica presenta manifestaciones claras que guían dicho diagnóstico, hay ocasiones en las que la sintomatología puede ser leve o inaparente. Así, para poder realizar un diagnóstico confirmatorio de leptospirosis, es necesario acudir a procedimientos de laboratorio (Ellis, 2015), que se dividen en dos grupos:

- *métodos indirectos*: son aquellos que detectan anticuerpos antileptospiras en el suero;
- *métodos directos*: son aquellos que evidencian la presencia de leptospiras (el microorganismo o componentes del mismo como antígenos o ácidos nucleicos) en los tejidos de animales o en sus líquidos corporales.

En la figura 1 se representa en forma de esquema las distintas etapas de la infección y el tipo de método diagnóstico a aplicar, sea directo, indirecto o ambos.

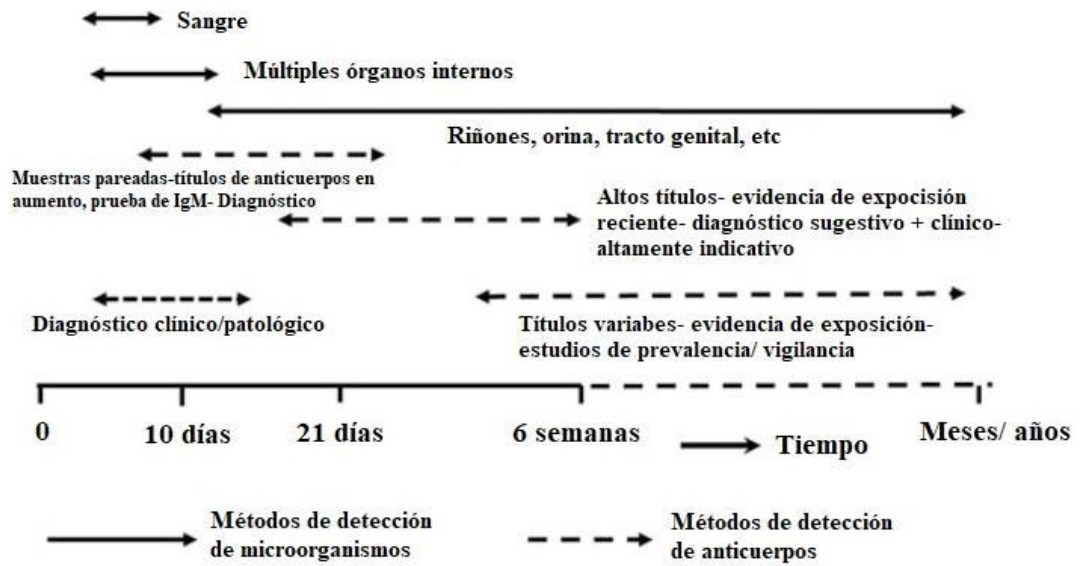


Figura 1. Idoneidad de las pruebas diagnósticas serológicas y de detección del microorganismo. Adaptado de Ellis (2015)

1.6.1. Métodos indirectos

Los métodos de detección de anticuerpos son los más utilizados para el diagnóstico de leptospirosis. La prueba de aglutinación microscópica (MAT, por *microscopic agglutination test*), desarrollada por Martin & Petit en el año 1918 y en la que se emplean antígenos vivos, es la prueba serológica estándar. Los requisitos mínimos son la utilización de antígenos de cepas representativas de todos los serogrupos existentes en el país o en la región en particular (Manual Terrestre de OIE, 2014; Ellis, 2015).

La sensibilidad de esta técnica depende de la etapa de la infección por la que está cursando el animal. La MAT presenta mayor sensibilidad cuando se utiliza en el diagnóstico de infección aguda, con aumento de títulos de anticuerpos en muestras pareadas (Ellis, 1986; Bolin, 2003). En contrapartida, en infecciones crónicas debido a serovares adaptados al huésped (Hardjo) la sensibilidad de la prueba es solo del 41 %; asimismo, cuando se utilizan títulos de corte de 100 e incluso cuando el título mínimo se reduce a 10, la sensibilidad de la prueba es solo el 67 % (Ellis, 1986). Se puede mejorar la sensibilidad de la prueba utilizando aislamientos locales en vez de cepas de referencia (Manual Terrestre de OIE, 2014).

Respecto a la especificidad de la MAT, los anticuerpos dirigidos a otros géneros microbianos no dan reacción cruzada con *Leptospira* spp., aunque existen reacciones serológicas cruzadas entre los distintos serovares del género *Leptospira*, por lo que esta técnica no permite confirmar fehacientemente el serovar infectivo. Para ello, se requiere el aislamiento de la bacteria mediante el cultivo microbiológico de la

muestra de elección según la cinética de la infección en curso (sangre en fase de leptospiremia y orina en fase de leptospiruria) (Bolin, 2003; Manual Terrestre de OIE, 2014). Los patrones de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada varían ampliamente entre especies de animales y entre individuos de una misma especie; sin embargo, en general, se supone que el serovar infectante es el serovar al que este animal desarrolla el título más alto, pero no existe consenso al respecto (Bolin, 2003).

Otro inconveniente que presenta este método es que no es posible diferenciar los anticuerpos generados por una infección de aquellos anticuerpos generados en animales previamente vacunados (Manual Terrestre de la OIE, 2014). En casos de leptospirosis aguda o subaguda, si los animales no han sido vacunados en los últimos seis meses y presentan signos clínicos, un título alto (≥ 1000) de anticuerpos antileptospira es altamente sugestivo de leptospirosis (Bolin, 2003; Ellis, 2015). En el caso de abortos, la presencia de anticuerpos en el suero fetal es diagnóstico de infección con títulos frecuentemente muy bajos (10), hecho que requiere de un procedimiento modificado de la MAT en el laboratorio (Manual Terrestre de la OIE, 2014; Ellis, 2015). De todas maneras, la MAT tiene severas limitaciones en el diagnóstico de infecciones crónicas en animales individuales, tanto en el caso de aborto como en la identificación de portadores renales o genitales, pues los títulos están estáticos o aún pueden disminuir (Ellis, 2015). A su vez, en serovares adaptados al huésped, como el caso del serovar Hardjo en bovinos, la MAT puede ser utilizada para determinar la presencia de la enfermedad en un rodeo, no siendo una buena herramienta diagnóstica para predecir infección a nivel individual (Hathaway et al. 1986). En vacas abortadas debido a infecciones producidas por leptospiras del serovar Hardjo, hasta el 50 % de ellas podrán ser seronegativas al momento del aborto (Bolin, 2003).

Otro método posible para detectar anticuerpos antileptospiras es el enzoinmunoanálisis (ELISA, por *enzyme-linked immunosorbent assay*). Varios han sido desarrollados para su uso tanto en placas como en tiras reactivas, y algunos de ellos utilizan como antígenos suspensiones de bacterias inactivadas, mientras que otros recurren a proteínas de membrana externa. Los ELISA en base a preparaciones de bacterias enteras permiten obtener información acerca del serogrupo, por lo que pueden ser útiles para su uso en estudios epidemiológicos y en planes de control de la enfermedad. Por el contrario, los ELISA en base a proteínas de membrana externa, si bien son reactivos contra todas las leptospiras patógenas, no permiten obtener información acerca del serogrupo (Cousins et al. 1985; Manual Terrestre de la OIE, 2014; Ellis, 2015). En lo que refiere a este método para el diagnóstico de rodeos infectados por *Leptospira* serovar Hardjo, se ha desarrollado un ELISA para la detección de anticuerpos en muestras de leche. Se debe tener en cuenta que, al igual que el test serológico de referencia MAT, la aplicación de un método de ELISA no permite diferenciar anticuerpos vacunales de los generados por una infección natural (Pritchard, 2001). Un diagnóstico serológico concluyente de leptospirosis no se

puede hacer únicamente por ELISA, ya que es necesaria la confirmación de laboratorio a través de MAT, PCR o del cultivo (Picardeau et al. 2014).

1.6.2. Métodos directos

Los diferentes métodos directos de detección del microorganismo tienen aplicabilidad en los siguientes casos (Ellis, 2015):

- en la fase inicial de la infección, cuando la *Leptospira* spp. puede detectarse en la sangre y/o en la leche;
- en casos agudos no tratados, se trata de terneros nacidos muertos y de fetos abortados, que pueden indicar infección de múltiples órganos, principalmente el riñón, el hígado y el humor acuoso;
- cuando la bacteria se localiza en sitios inmunológicamente protegidos, como los túbulos proximales renales, el tracto genital y el ojo.

Los métodos disponibles que permiten evidenciar la presencia de leptospiras incluyen la visualización directa mediante MCO, pruebas inmunoquímicas (inmunofluorescencia directa, inmunohistoquímica), tinción argéntica, el cultivo microbiológico y la detección de ADN (Ellis, 2015).

La MCO permite visualizar las leptospiras en los fluidos corporales, principalmente en la orina, pero es de baja sensibilidad, carece de especificidad e insume mucho tiempo (Levett, 2001; Adler & Faine, 2006). Sin embargo, en muestras con alta carga bacteriana la observación inequívoca de las leptospiras por parte de personal experimentado puede proporcionar un rápido diagnóstico presuntivo (Adler & Faine, 2006). La eficacia de las pruebas inmunoquímicas (inmunofluorescencia e inmunohistoquímica) depende del número de microorganismos presentes en el tejido, no identifican el serovar infectante y son en general poco sensibles, por lo que se utilizan como técnicas complementarias (Manual Terrestre de OIE, 2014). La inmunofluorescencia es una prueba rápida y útil para analizar muestras de orina o tejidos fetales en buen estado de conservación (Bolin, 2003).

Al igual que con otras infecciones bacterianas, el cultivo, el aislamiento y la posterior identificación del organismo causal proporcionan una prueba inequívoca de la infección (Adler & Faine, 2006). Si bien es un método 100 % específico, su sensibilidad puede ser baja dependiendo de la muestra y del estado de infección del animal; de hecho, es posible aislar leptospiras a partir del cultivo de muestras de sangre, leche, orina, humor acuoso e inclusive diversos órganos (Ellis, 2015). Las especies patógenas de *Leptospira* son bacterias de crecimiento lento, los cultivos deben incubarse a 28-30°C y observarse en MCO al menos una vez por semana para detectar la presencia de *Leptospiras* spp., siendo necesario su seguimiento de entre 13 (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010) a 26 semanas (Ellis, 2015) antes de ser

descartados como negativos. Además, la posibilidad de éxito en la obtención de un cultivo positivo puede verse afectada por la presencia de otros géneros bacterianos de rápido crecimiento en la muestra a partir de la cual se intenta el aislamiento de leptospiras. Por estas razones, el cultivo microbiológico no se considera útil como una prueba de rutina para el diagnóstico, pero sigue siendo importante para fines epidemiológicos (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). De todas formas, el cultivo microbiológico seguido de aislamiento a partir de muestras de orina de animales crónicamente infectados a nivel de riñón es muy importante cuando se busca conocer e identificar cuáles son los serovares circulantes en un determinado rodeo (Manual Terrestre de OIE, 2014).

La detección de ADN específico de especies patógenas de *Leptospira* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) puede realizarse a partir de diferentes muestras biológicas. Entre los genes ampliamente utilizados para tal fin se incluyen *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* y *ligB* (Thaipadunpanit et al. 2011). La aplicación de estos métodos se encuentra en incremento debido a su alta sensibilidad y a que permiten llegar a un diagnóstico temprano, lo cual facilita a su vez la adopción de medidas de tratamiento y/o control de manera anticipada (Ellis, 2015). Se debe tener en cuenta que estos métodos deben ser validados de manera adecuada, considerando el tipo de muestra o de material biológico analizado y la especie animal en la que se aplica (Manual Terrestre de OIE, 2014). Un resultado de PCR positivo para cualquiera de estos genes específicos indica que una de las especies patógenas del género *Leptospira* está presente en la muestra, pero no puede ser utilizada para predecir el serovar (Picardeau et al. 2013).

1.7. Tratamiento y control de la leptospirosis

El tratamiento de la leptospirosis tanto en humanos como en animales infectados se basa en la utilización de antibióticos parenterales, aunque puedan diferir en la vía de administración, en el costo y en la duración, según la especie afectada. Existen diversos antibióticos utilizados, como ser la penicilina, la ampicilina, la amoxicilina, la tetraciclina, la estreptomycinina, la tulatromicina, la doxicilina, la eritromicina y las cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona y cefotaxime (WHO, 2003; Ellis, 2015). El tratamiento con antibióticos detiene la excreción urinaria y es probable que mejore los signos clínicos asociados con la colonización persistente del tracto reproductivo con el serovar Hardjo, pero no está claro por cuánto tiempo un animal tratado resiste la reinfección (Bolin, 2003; Martins & Lilenbaum, 2017).

Una única dosis de estreptomycinina (25 mg/kg) (Garristen et al. 1993) así como una o dos dosis de oxitetraciclina (20 mg/kg) con diez días de intervalo en bovinos (Alt et al. 2001) puede detener la eliminación de *Leptospira* spp. en la orina. Estudios realizados en vaquillonas infectadas experimentalmente demostraron que una dosis de tulatromicina a 2,5 mg/kg o ceftiofur cristalino a 6,6 mg/kg eliminó la *L. Hardjobovis* del tejido renal y su consecuente excreción en la orina (Cortese et al. 2007). Sin embargo, para un efectivo control de la infección por *Leptospira* spp., el

tratamiento con antibióticos únicamente no es suficiente, debiendo combinarse con un plan de vacunación acorde a cada situación particular (Bolin, 2003).

Las medidas de control utilizadas para disminuir la morbilidad y la mortalidad dependerán del serovar implicado en la enfermedad: en bovinos, estas incluyen tanto el tratamiento con antibióticos y la vacunación como también aplicación de medidas ambientales para disminuir la exposición al agente (Martins & Lilenbaum, 2017). Debe comprenderse que los programas de control no erradicarán el agente causal ni impedirán su transmisión, motivo por el cual deben ser aplicados de forma constante y a largo plazo (Martins & Lilenbaum, 2017). El control de la leptospirosis en animales de producción no solo es necesario para disminuir la enfermedad clínica y como consecuencia las pérdidas económicas, sino también para reducir el riesgo de exposición en humanos (Ellis, 1994; Manual Terrestre de OIE, 2014; Martins & Lilenbaum, 2017).

Se deben realizar esfuerzos para limitar el contacto directo e indirecto entre el ganado y los portadores de *Leptospiras* spp., como, por ejemplo, mediante el control de roedores, la presencia de suinos cerca de las instalaciones de bovinos así como los procedimientos de cuarentena para evitar la introducción de la bacteria en un rodeo mediante la compra de animales infectados (Bolin, 2003). De igual modo, la prevención de toda exposición a este tipo de bacterias es prácticamente imposible en la mayoría de los establecimientos pecuarios, por lo tanto, se confía en la vacunación para mejorar la resistencia de los animales a la infección con vacunas multivalentes que contengan los serovares de *Leptospira* presentes en la región (Ellis, 1984; Bolin, 2003). Cabe señalar que las vacunas por sí solas no eliminarán la infección de un rodeo infectado endémicamente y que no detendrán la excreción en el animal que ya está excretando *Leptospira* spp. en su orina; además, no siempre evitarán el aborto en animales en los que la infección placentaria ya haya ocurrido (Ellis, 1994). La OIE recomienda la vacunación de los animales antes de la exposición, para lo cual se debería adecuar los programas de vacunación a cada situación y población en cuestión, junto a las características del producto que se utilizará (Manual Terrestre de OIE, 2014).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Leptospirosis bovina: antecedentes internacionales

La leptospirosis bovina es una enfermedad de alcance mundial. En lo que respecta a la seroprevalencia de la enfermedad en bovinos, se reportan estudios en diferentes países, la mayoría de los cuales han sido realizados en bovinos sin sintomatología clínica compatible con leptospirosis y utilizando como método serológico la MAT. Así, en Alemania se reportaron prevalencias serológicas en bovinos de 6,2 % a nivel individual para títulos de corte a la MAT de 100 y 200, para título de 400 la seroprevalencia fue de 2,4 % (Schonberg et al. 1986). En Francia, en cambio, fue de un 1,8 % (Gaumont & Trap, 1986), en Holanda de un 26,1 %

(Bercovich, 1986) y en el Reino Unido 34,4 % (Pritchard, 1986), en todos los casos utilizando MAT y un título de corte de 100.

En Brasil se reportaron seroprevalencias individuales para leptospirosis en bovinos de un 55,1 %, (Pinto et al. 2015), de un 45,6 % (Hamond et al. 2014) y de un 23 % (Otaka et al. 2012), siendo el serogrupo Sejroe serovar Hardjo el más predominante en los tres trabajos. Sin embargo, cuando se incluyen en la MAT los aislamientos locales, se produce un aumento significativo ($p=0,001$, McNemar test) de 9,9 % en la detección de animales seroreactivos (Pinto et al. 2015). En Colombia, en el estudio realizado por León (2009) se detectó una seroprevalencia individual en bovinos de 16,4 % y de 32,5 % a nivel predial; debemos señalar que se tomó como título de corte 50 y que se encontró como serovar predominante Hardjoprajitno. Años después, Hernández-Rodríguez et al. (2011) reportaron que el 41 % de las muestras de suero estudiadas resultaron positivas a MAT con títulos ≥ 50 .

En Venezuela se reporta 88,4 % de seroprevalencia individual en bovinos a partir de muestras sospechosas de leptospirosis; allí el serovar predominante fue *Icterohaemorrhagiae*, tomándose como título de corte 100 (Van Balen et al. 2009). Méndez et al. (2013) hallaron un 52 % de seroprevalencia individual con título de corte 100 en bovinos pertenecientes a un único establecimiento de México, en donde el serovar predominante fue Hardjoprajitno. En Chile, Salgado et al. (2014) reportaron un 75 % de seroprevalencia a nivel predial, con título de corte de 100 y con prevalencia del serovar Hardjobovis.

En lo que respecta a los aislamientos de *Leptospira* spp., Chideroli et al. (2016) obtuvieron el primer aislamiento de *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis en Brasil a partir de orina de vacas con fallas reproductivas. Pinto et al. (2017) lograron 19 aislamientos de cepas de *Leptospira* pertenecientes a tres especies patógenas diferentes (*L. santarosai*, *L. alstonii* y *L. interrogans*). Estos aislamientos se agruparon en cinco serogrupos Grippotyphosa, Shermani, Tarassovi, Sarmin y Serjoe, resultando este último el serogrupo más frecuente. En cambio, en Argentina se obtuvieron aislamientos de *L. interrogans* a partir de muestras de bovinos con sintomatología compatible con leptospirosis aguda (Licoff et al. 2008; Draghi et al. 2011), mientras que en México se consiguieron aislamientos a partir de bovinos de *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa, *L. interrogans* serovar Hardjo, *L. santarosai* serovar Mini y *L. santarosai* serovar Tarassovi (Carmona-Gasca et al. 2011).

2.2. Antecedentes nacionales

Los primeros estudios de leptospirosis bovina en el Uruguay datan de 1958, cuando el Dr. Echenique y Br. Sosa de Caruso visualizan formas espiroquetales compatibles con *Leptospira* en cultivo de médula ósea de bovino de 20 días. En el año 1959, los Drs. Mederos y Casas Olascoaga realizan inoculación experimental de animales de laboratorio con orina de canino, logrando no solo reproducir el cuadro clínico y anátomo-patológico característico de la leptospirosis, sino también aislar

un germen con morfología compatible con leptospiras luego del cultivo en medios especiales. En colaboración con el Dr. Cacchione efectuaron estudios serológicos post-infección con el suero de cobayos, encontrando títulos para los serotipos Icterohemorrhagiae AB e Icterohemorrhagiae A.

En 1965, el Dr. Caffarena y colaboradores llevan a cabo los primeros estudios de seroprevalencia en bovinos, siendo esta de un 20 %. Posteriormente, Caffarena et al. (1971), en una investigación serológica de leptospirosis mediante la aplicación de MAT a diferentes especies, hallan un 24,42 % de seroprevalencia en bovinos de carne y un 64,11 % en bovinos de leche. Treinta años después, Repiso et al. (2002), en un estudio vinculado a enfermedades de la reproducción que afecta el ganado de carne, obtuvieron una seroprevalencia para leptospirosis de 38,5 % a nivel individual y de 71,2 % a nivel predial con títulos ≥ 200 , predominando los serovares Hardjo y Wolffi. El Dr. Gil (2001), en un monitoreo de salud animal en la cuenca sur de Uruguay, reporta una seroprevalencia de 14 % en bovinos de leche y de 61,5 % a nivel de predios con títulos a MAT ≥ 200 . Datos de la Dra. Easton (2006), obtenidos en un estudio sobre las principales causas infecciosas de abortos en bovinos, demuestran que en 99 de 431 fetos estudiados se detectaron anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira* spp. en líquido fetal, en suero materno o en ambos. Los títulos de corte para vincularlos con el aborto fueron: para los fetos mayor o igual a 10 y para los sueros maternos mayor o igual a 800.

En el período comprendido entre los años 2008 y 2012, el 56 % de las muestras remitidas al Servicio de Leptospirosis de la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca fueron reactivas al MAT con título de corte ≥ 200 (Suanes, 2013). Los serovares con mayor presencia desde el punto de vista serológico en la población bovina fueron Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi y Pomona (Suanes, 2013). En nuestro país el diagnóstico de la enfermedad en animales de producción y de compañía se ha realizado desde los años setenta a la fecha principalmente en el Laboratorio Central de la DILAVE mediante la detección de anticuerpos por MAT. En dicho laboratorio, para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos, se utiliza un panel de 8 antígenos que incluye los siguientes serovares: Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjoprajitno, Hardjobovis y Wolffi. En casos de fetos abortados se aplica MAT en suero fetal y técnicas histopatológicas en búsqueda de lesiones características, principalmente a nivel renal. En algunos casos y complementariamente se utilizan técnicas de tinción argéntica con la finalidad de visualizar morfologías espiroquetales en cortes histológicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leptospirosis es una enfermedad que genera un fuerte impacto en los sistemas productivos, razón por la cual es una de las causas más importantes de abortos y de mortalidad de terneros en el ganado vacuno, además de ser una zoonosis de alto

impacto desde el punto de vista de la salud pública. Particularmente en nuestro país, afecta en mayor medida a los trabajadores y a los profesionales vinculados a los sistemas agropecuarios (Repiso et al. 2005; Schelotto et al. 2012; Rosa, 2013; Meny et al. 2017); se trata, pues, de una enfermedad endémica que también produce brotes epidémicos con numerosos focos, asociados a factores ambientales, estacionales y también al manejo del ganado (Repiso et al. 2005; Dutra, 2013). Además de inducir abortos en vacas y vaquillonas infectadas, también genera otro tipo de consecuencias negativas, incluyendo merma en la producción lechera, mastitis, nacimiento de terneros enfermos y muerte de animales jóvenes, entre otros.

En Uruguay el diagnóstico de leptospirosis en bovinos se realiza principalmente mediante el método MAT, que se aplica a sueros de animales sospechosos de infección por leptospiras. La sensibilidad de dicho método en infecciones crónicas es limitada y la técnica revela múltiples reacciones cruzadas que impiden reconocer el serovar infectante. Dado que no es posible diferenciar si los anticuerpos provienen de una primo-infección o son el resultado de la respuesta del animal al uso de vacunas, al interpretar un resultado de MAT positivo deben tenerse en cuenta las manifestaciones clínicas del animal, así como también conocer la historia de inmunización de los animales bajo estudio. Actualmente, no se aplican de forma rutinaria métodos de confirmación del agente infeccioso para el diagnóstico de la enfermedad en animales.

En este marco resulta imperioso ampliar la metodología aplicada para el diagnóstico de la leptospirosis bovina, sumando métodos moleculares y/o microbiológicos tradicionales de forma rutinaria frente a la sospecha de focos de leptospirosis bovina. Asimismo, la aplicación de dichas técnicas favorecería un mayor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en el ganado bovino en el país.

4. HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo es que existe acuerdo entre los resultados obtenidos a partir de la aplicación de técnicas serológicas, bacteriológicas y métodos moleculares aplicadas en predios con sintomatología compatible con leptospirosis bovina.

5. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar el acuerdo entre las diferentes pruebas diagnósticas aplicadas en predios con sintomatología compatible con leptospirosis.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los títulos de anticuerpos antileptospira en suero de animales con sospecha de leptospirosis mediante MAT.

- Confirmar la presencia del agente en muestras biológicas obtenidas de animales sospechosos por medio de pruebas moleculares y aislamiento bacteriano.
- Medir el acuerdo entre los distintos métodos de diagnósticos aplicados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Elección de los predios a incluir en el muestreo

Se tomó como base para el estudio el diseño de muestreo realizado en el marco de los proyectos Alianza ANII ALI_1_2014_1_4982, “Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira spp.* aisladas de casos de leptospirosis bovina en Uruguay”, y ANII-INNOVAGRO FSA_1_2013_1_12557, “Tipificación y diagnóstico de *Leptospira pp.* por técnicas moleculares: hacia el diseño de vacunas recombinantes”. En el período comprendido entre enero de 2015 y octubre de 2017 se muestrearon 44 establecimientos con sintomatología clínica compatible con leptospirosis y/o serología positiva para *Leptospira spp.* en al menos un animal con títulos de anticuerpos antileptospira \geq a 200, considerándose cada predio muestreado como un foco de estudio. Los 44 focos fueron detectados a partir de la sospecha de leptospirosis por parte de veterinarios de libre ejercicio, reportada a la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE). Dentro de la sintomatología clínica se destacó la presencia de un bajo porcentaje de preñez, aborto, nacimiento de terneros débiles o muertos, fiebre, coluria o muerte. Se visitó cada establecimiento agropecuario para la colecta de muestras de orina y de sangre de animales vivos previo consentimiento de los productores.

Dentro de cada establecimiento se seleccionó una muestra de 19 animales con un nivel de confianza del 95 %, asumiendo una población de tamaño desconocido con al menos un individuo enfermo y una prevalencia mínima esperada del 15 % (ver: <<http://www.winepi.net/f101.php>>). La muestra estuvo conformada por animales con títulos a MAT con y sin sintomatología clínica, por animales sin título a MAT con y sin sintomatología clínica y por animales pertenecientes al lote sin datos previos de serología.

Durante la visita al predio se corroboraron los datos aportados al inicio del problema por el veterinario actuante, como la dotación animal, el tamaño del lote afectado, la categoría y la raza. Se recabaron datos sobre animales enfermos, sintomatología, tratamiento aplicado, vacunas contra leptospirosis utilizadas y frecuencia de vacunación.

7.2. Obtención de las muestras

Las muestras biológicas se colectaron durante la visita a predios utilizando las instalaciones destinadas al manejo de los animales (corrales y tubo), siguiendo las normas de bienestar animal. No se llevó a cabo ningún tipo de procedimiento

experimental ni sacrificio en los animales vivos: únicamente se extrajeron muestras biológicas en condiciones naturales, de acuerdo a las normas de la Comisión Honoraria de Ética Animal (CHEA).

- **Sangre:** se extrajeron 5 ml. de sangre por venopunción coccígea con aguja y jeringa estéril, que fue colocada en tubo sin anticoagulante y según el cuadro clínico fue colocada también en tubo con anticoagulante.
- **Orina:** para su extracción se administró furosemida al 5 % (Ripoll, Montevideo, Uruguay) por vía intramuscular a razón de 0,5 mg/kg de peso vivo. Se realizó masaje estimulador perivulvar para inducir la micción, y previamente se limpió la zona genitourinaria con algodón y alcohol 70 %. Se colectaron 40 ml. de la segunda fracción de orina en un frasco estéril: todas las muestras fueron identificadas del 1 al 19, con su correspondiente número de caravana de identificación individual según el Sistema Nacional de Información Ganadera del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (SNIG, MGAP). Se tomaron 100 µl de orina para cultivo microbiológico, mientras que el excedente, junto con la sangre, fue trasladado en conservadora isotérmica a 4°C al laboratorio.

7.3. Procesamiento de muestras

7.3.1. Serología por MAT

Esta actividad se realizó en el Departamento de Bacteriología, Servicio de Leptospirosis de la DILAVE, Montevideo (Uruguay).

Como antígenos se usaron cultivos vivos de 7 cepas de referencia, provenientes del Centro de Referencia de Leptospirosis “Instituto Osvaldo Cruz” de Río de Janeiro. Se incluyeron los siguientes serovares: Pomona, Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa y Canicola (ver anexo I).

El proceso se llevó a cabo en dos partes: una primera etapa cualitativa y una segunda etapa de titulación final. Para la titulación inicial se mezclaron por segmentos iguales una dilución 1/100 del suero en estudio con una suspensión de leptospiras vivas y, luego de una incubación a 29 °C durante dos horas, se observó si existía aglutinación mediante lectura en el MCO, con una titulación final en esta primera etapa de 200. Para cada reacción se utilizó un control negativo o testigo, formado por una dilución de ½ del serovar correspondiente y suero fisiológico tamponado pH 7,6. Luego se procedió a la titulación de anticuerpos contra el/los antígeno/s que dieron reacción positiva de aglutinación (50 % de leptospiras libres con respecto a una suspensión de antígeno usada como testigo). Para la titulación final, se repitió la reacción de aglutinación con el antígeno que dio positivo y se lo enfrentó a diluciones sucesivas al ½ a partir de la primera dilución 1/100 del suero problema. Se definió el título final de aglutinación como la inversa de la mayor dilución de suero capaz de aglutinar 50 % o más de las leptospiras presentes en el campo microscópico. La muestra de suero a analizar se consideró reactiva cuando

reaccionaba al menos con uno de los serovares utilizados como antígeno y con título de corte \geq a 200.

7.3.2. Detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira* mediante amplificación por PCR del gen *lipL32*

Para la detección de ADN específico de especies patógenas de *Leptospira* se amplificó el gen *lipL32* a partir de muestras de ADN extraídas de orina y de plasma, llevándose a cabo esta actividad en el Laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI) del Institut Pasteur de Montevideo.

Se tomaron 10 ml de cada muestra de orina, conservada en los frascos de colecta a 4 °C; además, se colocaron en tubos cónicos estériles para centrifuga de 15 ml y se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente (TA). Se descartó el sobrenadante, conservando los pellets para su posterior lavado con 10 ml de PBS 1X a TA, pH 7,45 e incubación a 37 °C durante 5 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm a TA durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron cada uno de los pellets en 1 ml de PBS 1X a TA en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó a 10.000 rpm a TA durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se conservaron los pellets a -20 °C hasta comenzar la extracción de ADN.

Para la detección de ADN a partir de plasma se centrifugó 1 mL de sangre entera anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetracético) a 300 rpm durante 8 minutos, a TA. Se retiraron 200 μ L de plasma a un eppendorf de 1,5 mL. Sobre este volumen se procedió a la extracción de ADN. La extracción y purificación de ADN se realizó utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Scientific, Alemania).

Las reacciones de amplificación, por su parte, se realizaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo 5 μ l Buffer 10X, 3 μ l MgCl₂ 25 mM, 2 μ l dNTPs 5 mM, 2,5 μ l BSA 5 mg/ml, 5 μ l oligonucleótido **lipL32F** 10 μ M (5'ATCTCCGTTGCACTCTTTGTC3'), 5 μ l **lipL32R** 10 μ M (5'ACCATCATCATCATCGTCCA 3') (Ahmed et al. 2006), 0,2 μ l de Taq 5U/ μ l, H₂O DNAsa/RNAsa Free y 5 μ l ADN molde o problema. Como control positivo se utilizó 1 μ l de ADN proveniente de la cepa de referencia *Leptospira borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo y como control negativo se reemplazó el volumen de ADN por 5 μ l de H₂O DNAsa/RNAsa Free.

Para cada una de las muestras se hizo en paralelo un control de inhibición, de modo de evidenciar posibles inhibidores de la reacción presentes en la muestra y que pudieran haberse copurificado con el ADN. Para cada control de inhibición se efectuó una reacción con el mismo volumen de ADN de la muestra al que se le adicionó 2 a 5 ng de ADN control positivo. Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, EE. UU) en las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5

minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto cada uno, con un ciclo de extensión final de 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y coloración con bromuro de etidio (0,5g/mL). Las condiciones de corrida fueron de 1-5 V por centímetro de separación entre cátodo y ánodo en buffer Tris Borato EDTA (TBE) 1X. Se cargaron 10 µl de cada producto de PCR + 2 µl de buffer de carga y 5 µl de marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron: una reacción positiva evidenció la amplificación de un fragmento de 474 pares de bases.

La puesta a punto y validación del método de PCR para el *gen lipL32* fue llevada a cabo por el equipo de trabajo de la UMPI, determinando la sensibilidad de este método de PCR en $\geq 10^3$ células de leptospiras. La especificidad fue determinada confirmando una reacción positiva con serovares relevantes de especies patógenas de *Leptospira* (*L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*) y una reacción de PCR negativa para la especie no patógenas *L. biflexa* y para otros géneros bacterianos no relacionados (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp.).

7.3.3. Cultivo y aislamiento

Se inocularon 100 µl de orina a campo inmediatamente luego de la extracción en un tubo conteniendo 5 ml de medio selectivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con 5-fluorouracilo (5-FU). A partir del tubo inicial se realizaron dos diluciones sucesivas de 1/50 en medio EMJH con 5FU y se incubaron a $29 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los cultivos fueron enviados al Departamento de Bacteriología, Servicio de Leptospirosis de la DILAVE en Montevideo, donde se realizó la primera observación de los cultivos por MCO a los 5 días y luego cada 1 o 2 semanas hasta evidenciar crecimiento de leptospiras y/o posibles contaminantes, durante 13 semanas (Faine et al. 1999). En los casos en los que se evidenció un crecimiento de leptospiras se pasaron 2 ml de cultivo muy lentamente, utilizando una jeringa estéril a través de un filtro de 0,2 µm a un tubo con 3 ml de EMJH. En aquellos casos en los que no se evidenció crecimiento positivo de leptospira los 2 mL del cultivo fueron pasados por el filtro a un tubo conteniendo 3 ml de EMJH + 5-FU. En los cultivos en los que se visualizaron formas compatibles con leptospiras se les realizó PCR para el *gen lipL32* a fin de confirmar la presencia de *Leptospira* patógena.

Una vez lograda la purificación y el aislamiento de *Leptospira* spp., los aislamientos fueron enviados al Institut Pasteur de Montevideo para ser identificados a nivel de especie mediante amplificación y secuenciación del gen codificante para el ARN ribosomal 16S (*rrs*) (Merien et al. 1992). La determinación de serogrupo se realizó por MAT mediante anticuerpos de referencia (obtenidos en el instituto KIT de Holanda) (ver anexo II). Por último, esta información de especie y serogrupo se

complementa con el resultado del análisis de loci de número variable de repeticiones en tándem (VNTR, por multilocus *variable number of tandem repeats*), que fueron realizados utilizando cinco marcadores para los loci VNTR 4, 7, 10, Lb4 y Lb5 según los métodos publicados. Así, mediante la combinación de métodos de tipificación serológicos y moleculares, es posible inferir el serovar de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaun et al. 2006).

7.3.4. Análisis estadístico

Fue empleado un método de estadística descriptiva para explicitar los porcentajes de positividad de los animales y de los establecimientos según cada prueba diagnóstica y la descripción de focos. Así, se utilizó el programa estadístico STATA 15.1 IC, con el que en una primera etapa se extrajo información para caracterizar los focos muestreados según la ubicación (departamento), el tipo de sistema (carnicero o lechero), la categoría animal y los antecedentes de vacunación. Se aplicó el test estadístico Chi-cuadrado a nivel individual y el test de Fisher a nivel de establecimientos para conocer si existe asociación estadísticamente significativa entre dos variables con un nivel de confianza de 95 % ($P < 0,05$).

Luego, se aplicó el índice Kappa de Cohen para medir el acuerdo entre los diferentes métodos de diagnóstico empleados. El índice de Kappa se utilizó para evaluar la concordancia entre las pruebas con un nivel de confianza del 95 %. Un valor dentro del rango 0-0,2 indica concordancia leve, 0,21-0,4 aceptable, 0,41-0,6 moderada, 0,61-0,8 sustancial, 0,81-1 casi perfecta a perfecta (Landis & Koch, 1977).

8. RESULTADOS

8.1. Descripción de los predios estudiados

Se muestrearon un total de 860 bovinos provenientes de 44 focos distribuidos en 13 de los 19 departamentos (ver figura 2): el 68 % (30/44) correspondieron a sistemas carniceros y el 32 % (14/44) a sistemas lecheros. Los animales de 42 focos (95,5 %, 42/44) presentaron problemas reproductivos como bajo porcentaje de preñez, abortos, nacimiento de terneros débiles y los animales de 2 focos (4,5 %, 2/44) hemoglobinuria, ictericia, palidez de mucosas y muerte. El mayor porcentaje de animales muestreados pertenece a la categoría vacas y vaquillonas de cría (83 %, 714/860). Los datos sin especificar atañen a hembras de aquellos predios en los que no se extrajo información sobre la categoría muestreada (ver cuadro I). Se recolectaron 860 muestras de sangre sin anticoagulante y orina, y 12 muestras de sangre con anticoagulante.

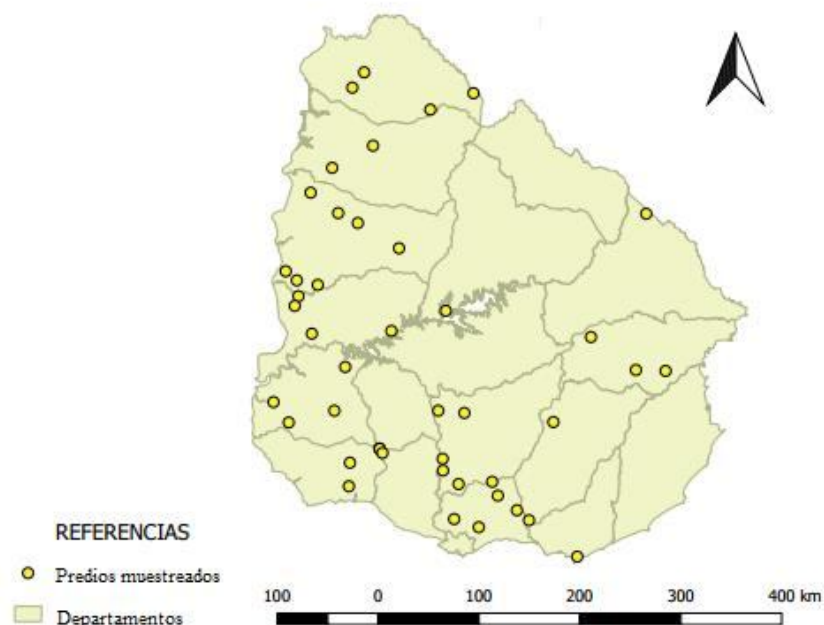


Figura 2. Predios muestreados en los diferentes departamentos de Uruguay.

Cuadro I. Distribución de animales muestreados por categoría.

Categoría	Frecuencia	Porcentaje
Vaca	418	48,6
Vaquillona	296	34,4
Novillo	20	3,1
Ternero	12	1,3
Toro	2	0,2
Hembras S/E	112	13
Total	860	100

*S/E: sin especificar

Dentro de los datos recabados en la visita a los predios se solicitó información sobre antecedentes de vacunación contra leptospirosis: no se obtuvieron datos concretos en todos los establecimientos acerca de la fecha de vacunación, de la aplicación de la revacunación, de la frecuencia y del tipo de vacuna empleada. Es por ello que se tomó el criterio de considerar como predio con antecedente de vacunación a aquel que aplicó al menos una dosis en los últimos 12 meses previos al muestreo. De los 44 establecimientos muestreados, el 57 % (25/44) aplicó vacunación, el 39 % (17/44) no aplicó vacunación y en el 4 % (2/44) de los establecimientos no contaban con dicha información registrada, lo que se corresponde a 490 animales con antecedentes de vacunación, 332 animales sin antecedentes de vacunación y 38 animales sin información.

8.2. Aplicación de MAT en suero de bovinos muestreados a campo

Los resultados del estudio de la presencia de anticuerpos antileptospira circulantes mostraron que de los 860 sueros de animales muestreados, un 39 % (339/860) fue reactivo al MAT. Sin embargo, si consideramos únicamente los animales reactivos provenientes de predios sin antecedentes de vacunación este porcentaje se reduce a 39 % (129/332) (ver cuadro II). En el cuadro II se visualiza un total de 822 muestras pues se excluyeron del análisis las 38 muestras para las cuales no se conoció el historial de vacunación. Para conocer si existía asociación entre MAT y vacunación se aplicó el test de Chi-cuadrado y se observó que no hay evidencia de una asociación estadísticamente significativa entre el resultado de MAT y antecedente de vacunación ($p > 0.05$). El 77 % de los sueros reactivos (261/339) corresponden a ganado de carne y el 23 % (78/339) a ganado lechero: al aplicar el test estadístico Chi-cuadrado se observó que existe asociación estadísticamente significativa entre el tipo de rubro y la frecuencia de animales seropositivos ($P < 0,05$).

Cuadro II. Resultado de la aplicación al MAT y antecedente de vacunación de los animales.

MAT	VACUNACIÓN		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	203	286	489
Positivo	129	204	333
Total	332	490	822

Pearson $\chi^2 = 0,6334$ Pr = 0,426

El serogrupo más frecuente con el que se detectó aglutinación fue Sejroe en un 22 % (189/860), luego sigue en frecuencia el serogrupo Pomona con un 9 % de sueros reactivos (79/860) y, posteriormente, los perfiles de aglutinación cruzada con los serogrupos Sejroe y Pomona, que se observó en el 7 % de los sueros estudiados (60/860). El 1 % (9/860) de la totalidad de los sueros muestreados presentó coaglutinación entre 2 o más combinaciones diferentes de los otros serogrupos enfrentados en el panel de antígenos del MAT, como por ejemplo Sejroe-Canicola, Pomona-Grippotyphosa, Sejroe-Pomona-Grippotyphosa (ver figura 3).

Por otro lado, en la figura 4 se presenta la frecuencia de sueros reactivos frente a antígenos de cada serovar del serogrupo Sejroe y sus coaglutinaciones. La mayoría de los sueros reactivos a dicho serogrupo presentaron coaglutinación a nivel de los tres serovares (Hardjobovis, Hardjoprajitno y Wolffi).

Si analizamos los datos de serología a nivel de establecimientos observamos que en el 95 % (42/44) de los predios se detectó al menos un animal reactivo a uno o a más de los serovares. Además, dentro de los 42 predios positivos al MAT, el 55 % (23/42) tenía antecedentes de vacunación.

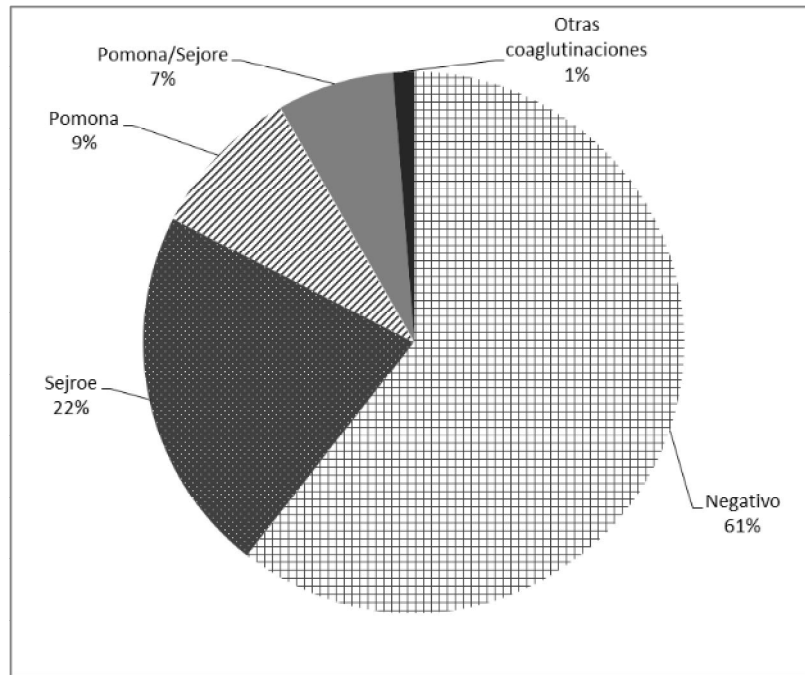
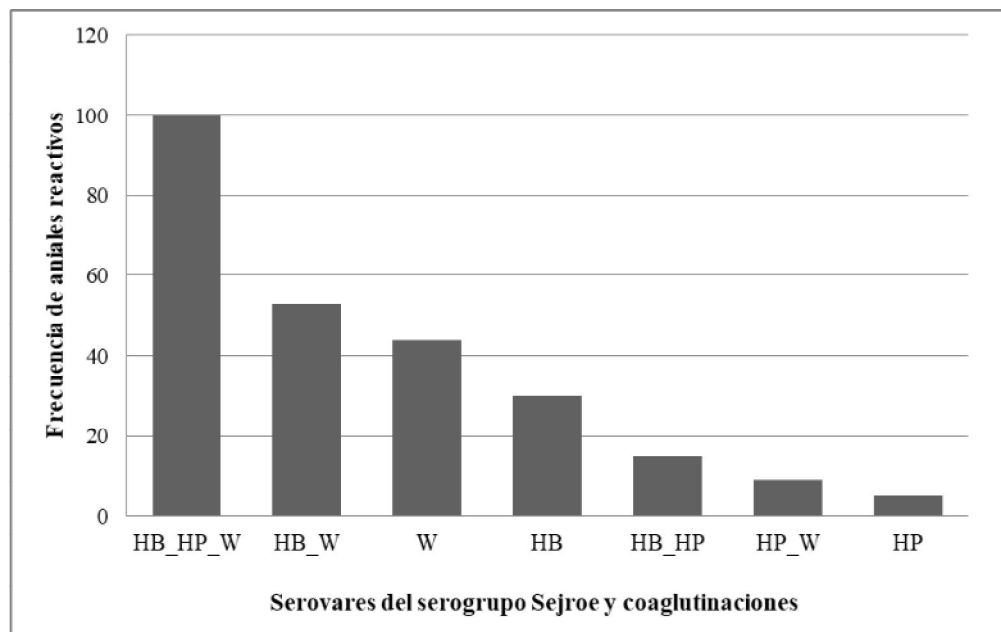


Figura 3. Porcentaje de aglutinación de los sueros de bovinos por serogrupo de antígenos utilizados para el MAT.



*HB: Hardjobovis; HP: Hardjoprajitno; W: Wolffi.

Figura 4. Frecuencia de sueros reactivos para cada serovar del serogrupo Sejroe y sus coaglutinaciones.

8.3. Detección de *Leptospira spp.* en muestras de orina y plasma colectadas de bovinos a campo mediante amplificación del gen *lipL32*

En el 75 % (33/44) de los establecimientos muestreados se detectó ADN de leptospiras patógenas mediante la amplificación del gen *lipL32* en al menos un animal. Al considerar los datos a nivel animal, el 19 % de las orinas colectadas (167/860) resultó positiva, lo que significa que al momento de la extracción de la muestra dichos animales estaban excretando leptospiras patógenas. De las 167 orinas positivas, el 84 % (141/167) corresponde a ganado de carne y el 16 % (26/167) a ganado lechero: existe asociación estadísticamente significativa entre el tipo de rubro y la amplificación del gen *lipL32* en orina ($P < 0,05$). Las doce muestras de plasma provenientes de animales con sospecha de leptospirosis aguda resultaron negativas por PCR.

En la figura 5 se muestra un ejemplo de análisis de muestras de orina por PCR para el gen *lipL32*, específico para especies patógenas de *Leptospira*. En la figura 5A se visualiza el resultado de PCR obtenido para 18 muestras de orina colectadas en un muestreo de campo. En las muestras 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 y 17 se observa un resultado positivo con visualización de un producto de amplificación esperado de 474 pares de bases. Como se puede observar, las muestras 8, 10 y 17 amplificaron una banda tenue. A su vez, en la figura 5B se visualiza el resultado obtenido para los controles de inhibición de las 18 orinas estudiadas, sin observarse efecto inhibitorio aparente en ninguna de las muestras analizadas.

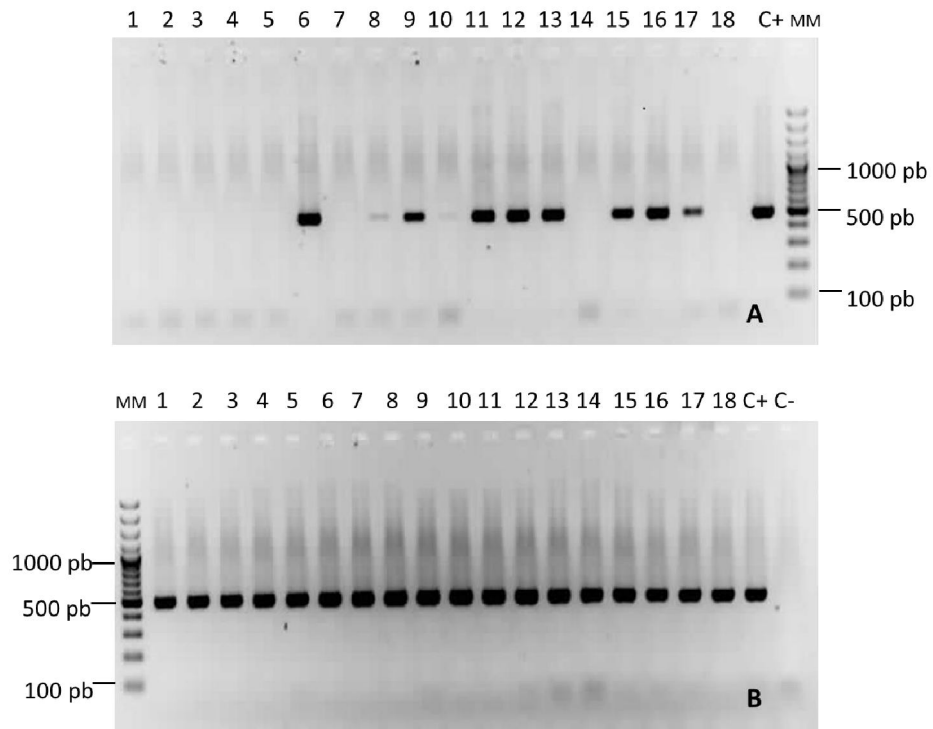


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de productos de amplificación del gen *lipL32* en muestras de orina. **A:** carriles 1 al 18: orina de animales 1 a 18; carril C+: control positivo; MM: marcador molecular. **B:** MM: marcador molecular, carriles 1 al 18: controles de inhibición de orina de animales 1 al 18; C+: control positivo; C-: control negativo.

8.4. Cultivo y aislamiento de *Leptospira spp.* a partir de muestras de orina y de sangre de bovinos a campo

Un total de 860 muestras de orina y 12 muestras de sangre fueron inoculadas en medio EMJH para cultivo microbiológico de *Leptospira spp.* Durante el seguimiento por MCO de dichos cultivos, se observaron formas compatibles con leptospiras para 37 muestras de orina, los cultivos realizados a partir de sangre resultaron negativos en su totalidad. De los 37 cultivos en los que se visualizaron formas compatibles, 31 provenían de orinas positivas a PCR para el gen *lipL32*, y 6 de orinas negativas a PCR. Los 37 cultivos fueron analizados por PCR para el gen *lipL32*, con lo que se pudo confirmar el crecimiento de una especie patógena de *Leptospira* en 33 de los 37 cultivos sospechosos. De estos 33 cultivos positivos para especies patógenas se obtuvieron 25 cultivos puros, observándose así una tasa de éxito de aislamientos de cultivos puros del 76 % (25/33). De los 4 cultivos negativos a PCR para el gen *lipL32*, en tres de ellos la PCR en muestras de orina resultó positiva y en uno de ellos negativa.

El 68 % (17/25) de los aislamientos se obtuvo a partir de vacas y el 32 % (8/25) de vaquillonas. Los animales a partir de los cuales se lograron los aislamientos se

encontraban en 11 focos distribuidos en los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Soriano, Florida y Canelones; 9 de los focos correspondieron a establecimientos dedicados a la ganadería y 2 a lechería.

Asimismo, en el cuadro III se presentan los resultados de identificación y de tipificación, combinando métodos serológicos y moleculares de los 25 aislamientos de *Leptospiras* spp. obtenidos a partir de muestras de orina. Mediante amplificación por PCR y secuenciación parcial del gen 16S (*rrs*), se determinó la especie *Leptospira* en los 25 aislamientos. Se identificaron tres especies diferentes: *L. interrogans* (n=19), *L. borgpetersenii* (n=2) y *L. noguchii* (n=4) (ver cuadro III).

Para determinar los serogrupos se realizó el MAT con una colección de 24 sueros inmunes de conejo de referencia, obtenidos contra diferentes cepas de referencia representativa de los serogrupos de *Leptospira* spp. más frecuentes. Todos los aislamientos de *L. interrogans* correspondieron al serogrupo Pomona, mientras que los aislamientos de *L. borgpetersenii*, al serogrupo Sejroe. Sin embargo, los aislamientos de *L. noguchii* mostraron títulos de aglutinación frente a una variedad más amplia de serogrupos, que incluyen *Autumnalis* (n=2), *Australis* (n=1), *Pyrogenes* (n=1).

A partir de los datos obtenidos para la identificación de las especies y de los serogrupos, se sumaron los datos correspondientes a los perfiles de VNTR obtenidos, con lo que fue posible asignar como serovar presuntivo Kennewicki a los 19 aislamientos de *L. interrogans* y como serovar presuntivo Hardjo a los 2 aislamientos de *L. borgpetersenii* (ver cuadro III). Las serovariedades de los aislamientos de *L. noguchii* no pudieron predecirse, dado que las tablas de perfiles de VNTR actuales no permiten la tipificación de esta especie.

Cuando analizamos los antecedentes de vacunación, observamos que en predios sin antecedentes de vacunación fueron obtenidos 15 aislamientos de *L. interrogans*, 1 de *L. borgpetersenii* y 1 de *L. noguchii*, mientras que en predios vacunados se obtuvieron 4 aislamientos de *L. interrogans*, 1 de *L. borgpetersenii* y 3 de *L. noguchii* (ver cuadro IV). El MAT fue capaz de predecir el serogrupo en 12 de 25 aislamientos. En el cuadro IV pueden verse 5 aislamientos más, en los que el serogrupo aislado concuerda con el del MAT, aunque no es concluyente, ya que dichos aislamientos provinieron de rodeos vacunados. En aquellos animales de los que se obtuvo aislamiento y el MAT resultó no reactivo para los serogrupos enfrentados, se evaluó la reactividad por MAT en otros animales del mismo predio, resultando que en 3 de 7 aislamientos se identificaron serogrupos homólogos.

Cuadro III. Identificación de los aislamientos de *Leptospira* spp. mediante combinación de métodos serológicos y moleculares.

Muestreo	Departamento	Id. Aislamiento	Especie (16S rrs)	Número de repetidos VNTR					Serogupo (MAT)	Serovar presuntivo (16S rrs+ VNTR+ MAT)
				4	7	10	Lb4	Lb5		
VIIP	Paysandú	IP1507003	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	5	Pomona (1600)	Kennewicki
VIIP	Paysandú	IP1512011	<i>L. interrogans</i>	5	1	10	NA	6	Pomona (1600)	Kennewicki
XIM	Canelones	IP1605020	<i>L. borgpetersenii</i>	NA	NA	1	5	5	Sejroe (1600)	Hardjo
XIIIP	Salto	IP1712056	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	5	Pomona (3200)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1509010	<i>L. interrogans</i>	5	1	10	NA	5	Pomona (3200)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1512014	<i>L. interrogans</i>	5	1	10	NA	6	Pomona (800)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1512016	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	6	Pomona (3200)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1609022	<i>L. interrogans</i>	5	1	10	NA	6	Pomona (3200)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1604019	<i>L. interrogans</i>	5	1	10	NA	6	Pomona (1600)	Kennewicki
XXIIP	Artigas	IP1603018	<i>L. interrogans</i>	5	0	10	NA	6	Pomona (1600)	Kennewicki
XXIXP	Salto	IP1605021	<i>L. noguchii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	Pyrogenes (800)	ND
XLVP	Artigas	IP1611024	<i>L. noguchii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	Australis (800)	ND
XLVIIP	Paysandú	IP1611026	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	6	Pomona (1600)	Kennewicki
XLVIIP	Paysandú	IP1611025	<i>L. noguchii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	Autumnalis (800)	ND
LIX P	Florida	IP1705032	<i>L. noguchii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	Autumnalis (800)	ND
LXXI P	Soriano	IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i>	NA	NA	1	5	4	Sejroe (3200)	Hardjo
LXXXIVP	Artigas	IP1712052	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	5	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710046	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (3200)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710041	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710039	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1712050	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	5	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710043	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710044	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (800)	Kennewicki
LXXXIVP	Artigas	IP1710045	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (1600)	Kennewicki
LXXXVIIP	Paysandú	IP1710047	<i>L. interrogans</i>	4	1	10	NA	4	Pomona (1600)	Kennewicki

* NA: no amplificó; NC: no corresponde; ND: no determinado.

Cuadro IV. Seroreactividad por MAT frente a antígenos de referencia e historia de vacunación en bovinos con cultivo positivo de *Leptospira* spp. en orina.

Id. aislamiento	Especie	Serogrupo/ serovar presuntivo	Seroreactividad del animal del cual se aisló	Seroreactividad en otros animales del mismo lote	Historia de vacunación en el lote
IP1507003	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (200)		No
IP1512011	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	NR	Pomona	No
IP1605020	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Sejroe (200)		Sí
IP1712056	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	NR	Pomona /Sejroe	No
IP1509010	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (400)		No
IP1512014	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (400)		No
IP1512016	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (800)		No
IP1609022	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (1600)		Sí
IP1604019	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (6400)		Sí
IP1603018	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (3200)		Sí
IP1605021	<i>L. noguchii</i>	Pyrogenes/ ND	NR	Sejroe	No
IP1611024	<i>L. noguchii</i>	Australis/ ND	NR	Pomona /Sejroe	Sí
IP1611026	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona(6400)/ Sejroe(1600)		Sí
IP1611025	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis/ ND	Sejroe (3200)		Sí
IP1705032	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis/ ND	NR	Pomona/Sejroe	Sí
IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	NR	Grippe /Sejroe	No
IP1712052	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (800)		No
IP1710046	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona(3200)/ Sejroe (800)		No
IP1710041	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona(6400)/ Sejroe (3200)		No
IP1710039	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (6400)		No
IP1712050	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (6400)		No
IP1710043	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona(3200)/ Sejroe (800)		No
IP 1710044	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona(3200)/ Sejroe (3200)		No
IP1710045	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	Pomona (6400)		No
IP1710047	<i>L. interrogans</i>	Pomona/ Kennewicki	NR	Sejroe	No

* ND: no determinado; NR: no reactivo.

8.5. Estudio de correlación entre las distintas metodologías aplicadas

Para establecer si hubo acuerdo entre las distintas técnicas de diagnóstico aplicadas a las diferentes muestras de bovinos analizadas en este trabajo, se calculó el índice Kappa de Cohen (k). Considerando los resultados a nivel individual se pudo observar que existe un acuerdo leve con un valor de $k= 0,18$ entre MAT y PCR, al

igual que entre MAT y cultivo con valor de $k= 0,05$ y $k= 0,23$ entre PCR y cultivo considerándose un acuerdo aceptable.

En el cuadro V se resume el comportamiento de cada técnica aplicada y la relación entre el método indirecto (MAT) y los métodos directos (PCR y Cultivo), así como la relación de los métodos directos entre sí.

Cuadro V. Acuerdo entre las distintas metodologías diagnósticas aplicadas a nivel individual. **A:** acuerdo entre MAT y PCR. **B:** acuerdo entre MAT y cultivo. **C:** acuerdo entre PCR y cultivo.

		PCR				
A	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	453	68	521	K	0,18
	Positivo	240	99	339	Agreement	64,2 %
	TOTAL	693	167	860	Desvío estándar	0,03
Pearson $\chi^2= 31,431$ Pr= 0,000						
		Cultivo				
B	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	508	13	521	K	0,05
	Positivo	315	24	339	Agreement	61,8 %
	TOTAL	823	37	860	Desvío estándar	0,01
Pearson $\chi^2= 10,564$ Pr= 0,001						
		Cultivo				
C	PCR	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	686	7	693	K	0,23
	Positivo	137	30	167	Agreement	83 %
	TOTAL	823	37	860	Desvío estándar	0,02
Pearson $\chi^2= 85,573$ Pr= 0,000						

Al aplicar el índice Kappa de Cohen a nivel de establecimientos se observó un acuerdo leve entre MAT y cultivo con un valor de $k= 0,04$ considerándose no significativo estadísticamente ($p>0,05$), y aceptable entre MAT y PCR y entre PCR y cultivo con valores de $k= 0,22$ para ambos. En el cuadro VI se resume el comportamiento de cada técnica aplicada a nivel de establecimientos y la relación tanto del método indirecto (MAT) con los métodos directos (PCR y Cultivo), como de los métodos directos entre sí.

Cuadro VI. Acuerdo entre las distintas metodologías diagnósticas aplicadas a nivel de establecimiento. **A:** acuerdo entre MAT y PCR. **B:** acuerdo entre MAT y cultivo. **C:** acuerdo entre PCR y cultivo.

		PCR				
A	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	2	0	2	K	0,22
	Positivo	9	33	42	Agreement	77,3 %
	TOTAL	11	33	44	Desvío estándar	0,09
					P	<0,05
		Cultivo				
B	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	2	0	2	K	0,04
	Positivo	27	15	42	Agreement	33,5 %
	TOTAL	29	15	44	Desvío estándar	0,04
					P	>0,05
		Cultivo				
C	PCR	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	10	1	11	K	0,22
	Positivo	19	14	33	Agreement	54,5 %
	TOTAL	29	15	44	Desvío estándar	0,11
					P	<0,05

Si bien se observó que no hay una asociación estadísticamente significativa entre el resultado de MAT y el antecedente de vacunación, debido a que el mayor número de sueros reactivos al MAT provienen de predios con antecedentes de vacunación, que no se obtuvieron datos precisos de la fecha de vacunación y que no es posible diferenciar si la reactividad de esos sueros es debida a una infección natural o la inmunización con vacunas, se evaluó el acuerdo de esta técnica con los métodos directos considerando los resultados obtenidos de las muestras de predios sin antecedentes de vacunación (ver cuadro VII). En función de los valores de índice kappa, se observa que el acuerdo entre MAT y PCR aumenta siendo $k= 0.26$ considerándose aceptable. Entre MAT y cultivo, sin embargo, continúa con un pobre acuerdo ($k=0.08$) y entre las técnicas directas de PCR y cultivo el acuerdo disminuye ($k= 0.16$).

Cuadro VII. Acuerdo entre las distintas metodologías diagnósticas aplicadas a nivel individual considerando los animales que no presentaban antecedente de vacunación (n= 332). **A:** acuerdo entre MAT y PCR. **B:** acuerdo entre MAT y Cultivo. **C-** Acuerdo entre PCR y Cultivo.

		PCR				
A-	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	155	48	203	K	0.26
	Positivo	66	63	129	Agreement	66%
	TOTAL	221	111	332	Desvío estándar	0.05
Pearson chi2= 22,492 Pr= 0,000						
		Cultivo				
B-	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	197	6	203	K	0.08
	Positivo	116	13	129	Agreement	63%
	TOTAL	313	19	332	Desvío estándar	0.03
Pearson chi2= 7,415 Pr= 0,006						
		Cultivo				
C-	PCR	Negativo	Positivo	TOTAL		
	Negativo	218	3	221	K	0.16
	Positivo	95	16	111	Agreement	70%
	TOTAL	313	19	332	Desvío estándar	0.03
Pearson chi2= 23,347 Pr= 0,000						

En el cuadro VIII se resume el comportamiento de cada técnica aplicada y la relación tanto del MAT con PCR y cultivo, como de PCR y cultivo entre sí a nivel de establecimientos no vacunados. La totalidad de los establecimientos sin vacunación resultó poseer al menos una animal con títulos de anticuerpos antileptospiras en suero, en 16/17 establecimientos se detectó ADN de leptospiras patógenas mediante PCR para el gen *lipL32* y en 7/17 establecimientos fue posible visualizar al menos un cultivo sospechoso, resultando posteriormente en aislamientos provenientes de 6 predios. Debido a el tamaño de la muestras de predios no vacunados (n=17) no fue posible calcular el valor de Kappa para los distintos métodos diagnósticos.

Cuadro VIII. Tablas de contingencia entre las distintas metodologías diagnósticas aplicadas a nivel de establecimientos sin vacunación. **A:** MAT y PCR. **B:** MAT y Cultivo. **C:** PCR y Cultivo.

		PCR		
A-	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL
	Negativo	0	0	0
	Positivo	1	16	17
	TOTAL	1	16	17

		Cultivo		
B-	MAT	Negativo	Positivo	TOTAL
	Negativo	0	0	0
	Positivo	10	7	17
	TOTAL	10	7	17

		Cultivo		
C-	PCR	Negativo	Positivo	TOTAL
	Negativo	1	0	1
	Positivo	9	7	16
	TOTAL	10	7	17

Al analizar específicamente el resultado serológico y PCR se observa que de los 339 animales con serología positiva, 99 se encontraban excretando *Leptospiras* por orina, siendo ello detectado por PCR *lipL32*. Se analizó la distribución de animales seroreactivos a MAT según título de corte para los serogrupos Pomona y Sejroe junto al resultado de la aplicación de PCR, tanto para los animales con antecedente de vacunación (n=490) como para aquellos que no tenían antecedentes de vacunación (n=332) representándose en los gráficos de la figura 6. De los 490 animales que contaban con antecedente de vacunación, 390 resultaron no reactivos al MAT para el serogrupo Pomona, de estos animales, 348 resultaron negativos a PCR para el gen *lipL32* y 42 positivos. Los 100 sueros reaccionantes al serogrupo Pomona provenientes de animales con antecedente de vacunación se representan en la figura 6A. De los animales que no contaban con antecedentes de vacunación (n=332), 288 resultaron no reactivos al MAT para el serogrupo Pomona, de éstos animales 204 resultaron negativos a PCR y 84 positivos. En la figura 6B se representan los 44 sueros reaccionantes al serogrupo Pomona de animales sin antecedentes de vacunación según título de corte y resultado de PCR. En lo que respecta al serogrupo Sejroe, de los 490 sueros provenientes de animales con antecedentes de vacunación, 333 resultaron no reactivos a MAT para este serogrupo. De los animales cuyos sueros resultaron no reactivos (n=333) 307 arrojaron resultado negativo a PCR para el gen *lipL32* y 26 positivos. Los 157 sueros positivos a MAT para el serogrupo Sejroe provenientes de animales con antecedente de vacunación fueron representados en la figura 6C según título de corte y resultado de PCR. De los animales que no contaban con antecedentes de vacunación (n=332), 237 resultaron no reactivos al

MAT para el serogrupo Sejroe, de los cuales 168 resultaron negativos a PCR y 69 positivos. En la figura 6D se representan los 95 sueros reaccionantes al serogrupo Sejroe de animales sin antecedentes de vacunación según título de corte y resultado de PCR. Se observa que no existe una tendencia en cuanto a número de animales reactivos a MAT según título de corte para ambos serogrupos y número de animales positivos a PCR.

En el anexo III se detallan los 44 establecimientos muestreados con los resultados globales de las técnicas aplicadas.

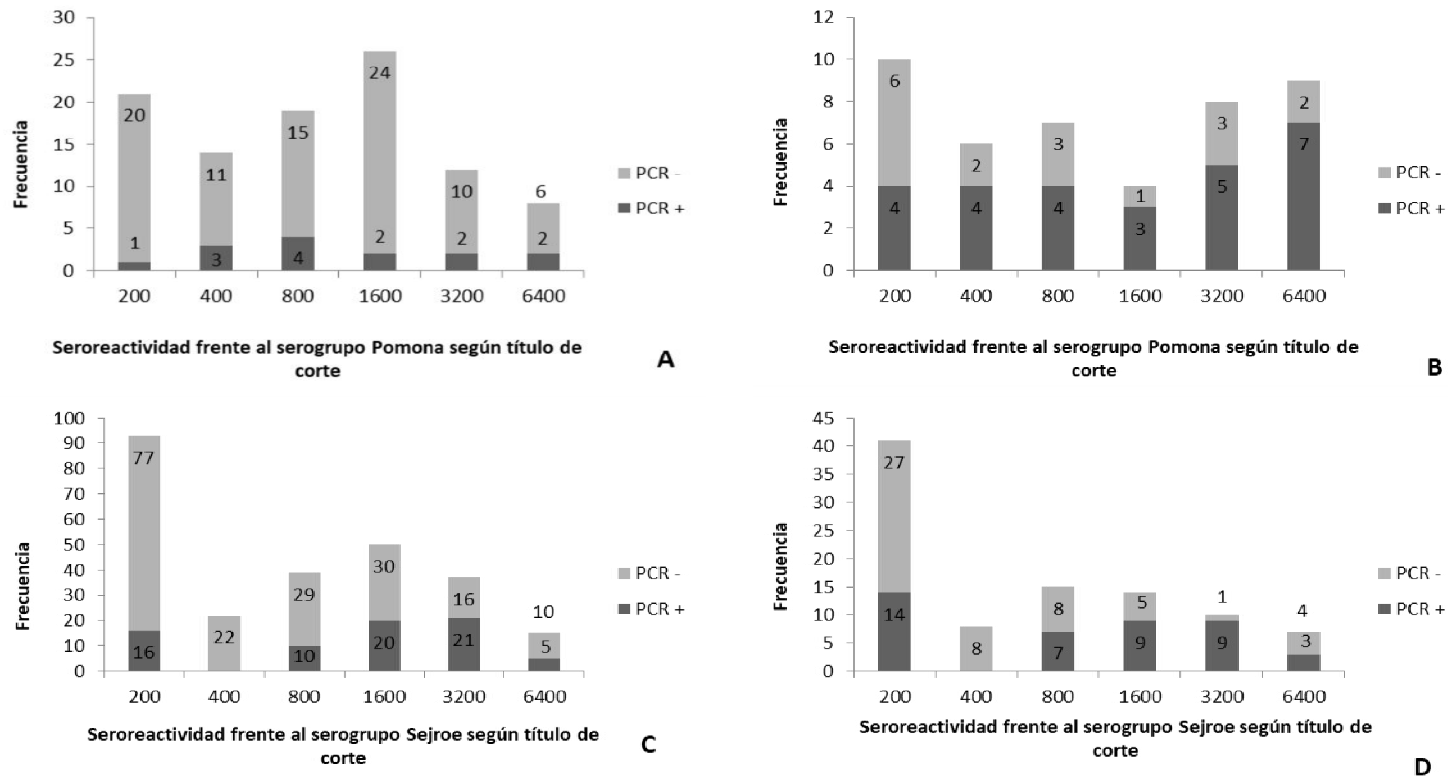


Figura 6. Frecuencia de animales positivos y negativos a PCR *lipL32* y reactivos al serogrupo Pomona y Sejroe según título de corte al MAT. **A:** Frecuencia de animales PCR *lipL32* positivos y negativos según títulos de corte al MAT para el serogrupo Pomona en animales con antecedente de vacunación. **B:** Frecuencia de animales PCR *lipL32* positivos y negativos según títulos de corte al MAT para el serogrupo Pomona en animales sin vacunación. **C:** Frecuencia de animales PCR *lipL32* positivos y negativos según títulos de corte al MAT para el serogrupo Sejroe en animales con antecedente de vacunación. **D:** Frecuencia de animales PCR *lipL32* positivos y negativos según títulos de corte al MAT para el serogrupo Sejroe en animales sin antecedentes de vacunación.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que existe acuerdo leve a aceptable (Landis & Koch, 1977) entre los métodos de diagnóstico de leptospirosis indirectos (MAT) y directos (cultivo y PCR) aplicados en muestras obtenidas de rodeos con sintomatología compatible con leptospirosis bovina de distintos departamentos de Uruguay. Este es el primer estudio en Uruguay del comportamiento de dichas técnicas diagnósticas, ya que tanto el cultivo como PCR no se utilizaban en el país en el área pecuaria hasta el comienzo de los proyectos multicéntricos Alianza ANII ALI_1_2014_1_4982, “Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira spp.* aisladas de casos de leptospirosis bovina en Uruguay”, y ANII-INNOVAGRO FSA_1_2013_1_12557, “Tipificación y diagnóstico de *Leptospira pp.* por técnicas moleculares: hacia el diseño de vacunas recombinantes”. El hecho de que varias instituciones gubernamentales y de investigación participaran en el desarrollo de ambos proyectos integrando conocimientos ha permitido obtener el primer banco de leptospirosis patógenas de dominio público en Uruguay, la mayoría de ellos ya tipificados en términos de especies, serogrupos y serovar (ver anexo IV, Zarantonelli et al. 2018, en revisión).

Los establecimientos pecuarios de los cuales se obtuvieron las muestras analizadas en este estudio fueron seleccionados en base a antecedentes clínicos compatibles con leptospirosis y/o resultados previos de serología positiva por MAT; por lo tanto, el hecho de que el 95 % (42/44) de los predios analizados resultaran positivos a MAT concuerda con lo esperado. Los dos predios negativos a MAT al momento del muestreo también resultaron negativos a PCR *lipL32* y al cultivo: como antecedente contaban con serología positiva para los serogrupos Sejroe y Pomona (uno de ellos), junto con el antecedente de vacunación y aborto. Los resultados a nivel individual revelan que el 39 % (339/860) de los animales muestreados presentó títulos de anticuerpos frente a *Leptospira spp.* enfrentados a antígenos correspondientes a 7 serovares. Cabe destacar que en el presente trabajo en el 57% (25/44) de los predios había sido utilizada la inmunización dentro de los 12 meses previos al muestreo, con un 42 % de sueros reactivos (204/490) provenientes de animales de dichos establecimientos, por lo que no es posible determinar si los títulos de anticuerpos corresponden a la exposición previa al agente o a títulos vacinales (Hodges & Day, 1987; Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Al analizar los resultados serológicos de predios sin antecedente de vacunación resulta que el 39% (129/332) de los animales muestreados presentaron títulos de anticuerpos; en correspondencia con los resultados obtenidos por Hamond et al. (2014) quienes hallaron un 45,6% de seroreactividad enfrentando sus sueros a 28 serovares y por Hernández- Rodríguez et al. (2011) quienes reportaron 33% de seroreactividad utilizando 7 serovares, ambos con títulos mayor o igual a 200. Otaka et al. (2012) obtuvieron 23% de seroreactividad enfrentando los sueros a 24 serovares con título de corte de 100.

La predominancia en la seroreactividad frente al serogrupo Sejroe no fue sorprendente. El bovino actúa como huésped de mantenimiento para Hardjobovis y Hardjoprajitno, ambos asociados a fallas reproductivas (Ellis, 2015). La elevada seroreactividad frente al serovar Wolffi dentro del serogrupo Sejroe concuerda con los datos hallados históricamente en Uruguay y con trabajos realizados en otras partes del mundo; dicho hallazgo podría asumirse como reacciones cruzadas dentro del serogrupo Sejroe (Faine, 1982; Aguiar et al. 2006; Suanes, 2013; Campos et al. 2017). La elevada seroreactividad frente al serogrupo Pomona, serovar Pomona tampoco ha sido un hallazgo sorprendente: ya los cerdos son los huéspedes de mantenimiento para dicho serogrupo, tanto para el serovar Pomona como Kennewicki (Ellis, 2012). En nuestras condiciones de producción, donde frecuentemente los productores realizan cría de cerdos para consumo propio, se favorece la interacción entre bovinos y suinos beneficiando la ocurrencia de la enfermedad incidental en bovinos con la presentación de tormentas de abortos, no descartando la presencia de jabalíes como potencial huésped de los serovares Pomona y Kennewicki (Ellis, 1994; Ellis, 2015).

La utilización de amplificación de ácidos nucleicos por PCR se ha vuelto una herramienta valiosa para lograr un diagnóstico rápido de leptospirosis (Hamond et al. 2015). La aplicación de esta técnica permitió detectar *Leptospiras spp.* patógenas en el 19 % de las orinas colectadas (167/860). También permitió priorizar el seguimiento de los cultivos, maximizando las posibilidades de obtención de aislamientos. El protocolo de PCR convencional utilizado en este trabajo tiene un límite de detección de 10^3 leptospiras (ver anexo IV, Zarantonelli et al. 2018, en revisión). Si tenemos en cuenta que se procesaron 10 ml de muestras de orina analizada, es necesario que el animal esté eliminando al menos 100 leptospiras por mililitro de orina para tener un resultado positivo por esta técnica. Además, los resultados del método de PCR en orina deben ser expresados con precaución, ya que cabe la posibilidad de resultados negativos debido a la eliminación intermitente de *Leptospiras spp.* (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010; Ribeiro Rocha et al. 2017). Lo mismo sucede en muestras de sangre provenientes de animales recientemente infectados, en donde es posible un resultado negativo a PCR debido a la corta fase de bacteriemia (Ellis, 2015).

El cultivo microbiológico es la técnica *gold standard* y constituye el diagnóstico definitivo: tiene baja sensibilidad, es dificultoso y requiere largos períodos de incubación para lograr el aislamiento (Adler & de Peña Moctezuma, 2010). Hernández-Rodríguez et al. (2011) obtuvieron un 37 % de cultivos positivos; esto pudo haberse visto favorecido por la técnica empleada desde la extracción de la muestra hasta su cultivo propiamente dicho, pues la orina fue filtrada y tamponada con PBS, pese a que la micción fue producida espontáneamente sin el uso de Furosemida. Nervig & Garret (1979) reportaron una mayor recuperación de *Leptospira spp.* y una menor contaminación en orinas obtenidas luego de la administración de Furosemida en comparación con la orina obtenida mediante

estimulación manual. En el presente trabajo se visualizaron 37/860 cultivos al MCO, de los cuales fueron confirmados 33 por PCR, resultando finalmente en 3,8 % (33/860) de cultivos positivos para leptospiras patógenas. La alta carga de contaminantes presentes en las muestras de origen animal tomadas en condiciones de campo puede influenciar el bajo porcentaje de cultivos positivos (Hernández-Rodríguez et al. 2011), a pesar de haber rutinariamente limpiado la zona perineal y aplicado Furosemida. De los 4 cultivos negativos a PCR tres de ellos provenían de muestras de orina positivas a PCR para el gen *lipL32*, en donde se visualizaron formas compatibles con leptospiras patógenas al MCO en los tubos de cultivo y sin embargo la PCR en cultivo resultó negativa, detectando en uno de ellos leptospiras saprófitas. El cuatro cultivo positivo a MCO y negativo a PCR provenía de una muestra de orina negativa a PCR para el gen *lipL32* enfrentándonos a una de las limitaciones de la técnica, la sensibilidad.

Del total de los 25 aislamientos obtenidos, se reveló la presencia de tres especies diferentes. Los aislamientos se correspondieron a *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, y *L. noguchii*, conociéndose que las dos primeras especies son los principales agentes infecciosos en bovinos (Ellis, 2015); no obstante, *L. noguchii* también ha sido aislada de bovinos en Brasil (Martins et al. 2014; Hamond et al. 2015; Libonati et al. 2017). Los 19 aislamientos de *L. interrogans* pertenecían al serovar Kennewicki, serogrupo Pomona, los 2 aislamientos de *L. borgpetersenii* al serovar Hardjo, serogrupo Sejroe, aunque los 4 aislamientos de *L. noguchii* presentaron tres serogrupos diferentes (*Autumnalis*, *Australis* y *Pyrogenes*), no siendo posible hasta el momento identificar los serovares. Los resultados obtenidos por Bolin & Zuerner (1996), en los cuales los aislamientos de Kennewicki serogrupo Pomona muestran gran estabilidad de los perfiles genéticos dentro de un brote, resultan consistentes con el trabajo realizado en nuestro país, dado que todos los aislamientos de *L. interrogans* pertenecían al serovar Kennewicki (serogrupo Pomona), mostrando el único genotipo secY A. De manera similar, todos los aislamientos de *L. borgpetersenii* pertenecían al serotipo Hardjo (serogrupo Sejroe) y presentaron el mismo genotipo secY B (ver anexo IV, Zarantonelli et al. 2018, en revisión). La elevada proporción de aislamientos pertenecientes al serogrupo Pomona en bovinos concuerda con los datos reportados en otras partes del mundo (Arent et al. 2017). Merece la pena resaltar que la especie *L. interrogans*, serovar Kennewicki, serogrupo Pomona, ha sido aislada recientemente en Uruguay de trabajadores rurales (Meny et al. 2017): el estrecho contacto con los bovinos puede haber favorecido la infección.

Actualmente, en nuestro país se comercializan vacunas tipo bacterinas de diversas especies y serovares de *Leptospira*; sin embargo, según nuestro conocimiento, ninguna de ellas contiene *L. interrogans* serovar Kennewicki serogrupo Pomona, ni tampoco ninguna de las serovarietades de la especie *L. noguchii*. Diferentes estudios han demostrado que la utilización de vacunas podría disminuir significativamente la eliminación de *Leptospira spp.* por orina e incluso las lesiones renales (Bolin & Alt, 2001; Vallée et al. 2016), con la salvedad de que las

vacunas utilizadas sean las que contengan los serovares presentes en el rodeo (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Igualmente, no son capaces por sí solas de detener la excreción por orina en el animal previamente infectado con leptospiras patógenas y no siempre evitarán el aborto en animales en los que la localización placentaria ya haya ocurrido (Ellis, 1994). Los programas sistemáticos de vacunación en Nueva Zelanda, donde se comenzó a inmunizar a los bovinos con 4 meses de edad, favorecieron la disminución de la incidencia de la enfermedad tanto en animales como en humanos (Thornley et al. 2002; Mackintosh, 2014).

Las bacterinas provocan inmunidad dirigida principalmente contra el antígeno lipopolisacárido bacteriano específico de serovar, T-independiente con implicancia de anticuerpos IgM y falta de una respuesta de memoria (Adler, 2015). La duración de la inmunidad es, por lo tanto, relativamente corta, y se recomienda la vacunación anual en casi todos los casos e incluso con mayor frecuencia en predios con diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, se necesita más investigación para obtener efectos de vacunación de larga duración y protección completa contra la infección bacteriana. Es probable que se necesite una respuesta inmune celular protectora en el modelo de ganado (Naiman et al. 2001; Naiman et al. 2002) para generar una vacuna altamente eficaz contra la leptospirosis, y no solo la respuesta humoral desencadenada por bacterinas de las células muertas.

Las diferentes técnicas aplicadas presentaron acuerdo leve a aceptable entre sí. El método indirecto MAT presentó acuerdo aceptable con PCR ($k= 0,26$) y leve con el cultivo ($k= 0,08$) considerando los resultados de MAT de sueros provenientes de animales sin vacunación, lo que no resultó sorprendente, ya que el primero detecta la presencia de anticuerpos y los otros detectan la presencia del agente infeccioso. Al igual que lo ocurrido en el trabajo de Hamond et al. (2014), el MAT no fue capaz de detectar animales que se encontraban excretando leptospiras al momento del muestreo (48 muestras MAT-/PCR+). Las leptospiras en los túbulos renales son capaces de formar biofilms, protegiéndose del sistema inmune, sumado a que los animales con infección crónica pueden tener títulos indetectables (Ristow et al. 2008; Libonati et al. 2017). Por otra parte, mediante la vacunación con bacterinas que incluyen los serotipos infecciosos se logra una reducción significativa de la colonización renal bovina y la excreción urinaria. Se observa que no existe una tendencia en cuanto a número de animales reactivos a MAT según título de corte para ambos serogrupos y número de animales positivos a PCR. La eliminación de las leptospiras en la orina se produce de forma intermitente, y no está relacionada con los niveles de anticuerpos (Adler & de Peña Moctezuma, 2010). El MAT no permitió predecir ninguno de los aislamientos de *L. noguchii* probablemente debido a que los serogrupos correspondientes a estos aislamientos no están incluidos dentro del panel actual de antígenos de referencia en DILAVE Central. De todas formas, fue capaz de predecir el serogrupo en 15 animales de los que se obtuvo aislamiento, en los que el MAT a nivel individual e incluso a nivel de establecimientos predijo el serogrupo que logró aislarse (Zuerner et al. 2011). La inclusión en el MAT de los aislamientos

aislados localmente podría aumentar la sensibilidad de la técnica, creciendo la proporción de animales seroreactivos (Sarmiento et al. 2012; Pinto et al. 2015). Sin embargo, la utilización de estas cepas por parte de cada laboratorio de diagnóstico en distintas áreas, puede conducir a la pérdida de estandarización y repetitividad de la técnica (Lilenbaum & Martins 2014).

El acuerdo entre las técnicas directas fue leve, si bien ambas detectan la presencia del agente, presentan ventajas y limitaciones. El PCR detecta la presencia de ADN de leptospiras patógenas sin importar su viabilidad, mientras que el cultivo además de ser laborioso e insumir varias semanas se basa en la visualización de *Leptospiras spp.* vivas. Seis muestras de orina resultaron negativas a PCR siendo positivas al cultivo, por lo tanto, un cultivo no puede ser descartado luego de un resultado negativo de PCR *lipL32* en la muestra sin incubarlo y realizar su seguimiento durante 13 semanas (Faine, 1999). La discrepancia observada podría estar explicada por varios factores, como puede ser un bajo número de bacterias en la orina que no son detectadas debido al límite de sensibilidad del método de PCR o a los efectos inhibitorios asociados a las muestras de orina.

10. CONCLUSIONES

Las diferentes técnicas diagnósticas aplicadas (MAT, PCR y cultivo microbiológico) presentaron un acuerdo leve a aceptable en predios con sintomatología clínica compatible con leptospirosis bovina. De todas maneras, cada técnica evidenció sus virtudes, por lo que se considera de suma importancia que el país cuente con dichas herramientas tanto para el diagnóstico como para los estudios epidemiológicos de la enfermedad. Se obtuvieron 25 aislamientos pertenecientes a las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii* provenientes de rodeos bovinos con sospecha de leptospirosis, originarios de distintos departamentos del Uruguay.

Los aislamientos obtenidos hasta el momento evidencian la importancia del relevamiento de serovares autóctonos, tanto para la inclusión de serovares ausentes en las vacunas comercializadas en nuestro país como estudios epidemiológicos. Deben incluirse en el MAT cepas de referencia pertenecientes a los serogrupos *Pyrogenes*, *Australis* y *Autumnalis* debido al aislamiento de cepas autóctonas pertenecientes a dichos serogrupos, lo cual podría aumentar la sensibilidad de la técnica.

Es necesario asimismo continuar con estudios epidemiológicos con un diseño tal que permitan conocer el impacto de la enfermedad en los sistemas productivos y en la salud pública involucrando los distintos departamentos del Uruguay. Son también necesarios estudios de patogenicidad de los aislamientos locales para evaluar su importancia en bovinos y la pertinencia de su incorporación en la formulación de vacunas comerciales de uso en el país.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adler B, de la Peña Moctezuma A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140: 287- 296.
2. Adler B, Faine S. (2006). The Genus *Leptospira*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (Eds.) *The Prokaryotes*. 7: 294-327.
3. Adler B. (2015). Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387: 251-272.
4. Aguiar DM, Gennari SM, Cavalcante GT, Labruna MB, Vasconcellos SA, Rodrigues AAR, Moraes ZM, Camargo LMA. (2006). Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesq. Vet. Bras*. 26(2): 102-104.
5. Ahmed N, Devi SM, Valverde MA, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5: 28.
6. Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA. (2001). Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *JAVMA*, 219(5): 636-639.
7. Arent ZJ, Gilmore C, San-Miguel Ayanz JM, Neyra LQ, Garcia-Pena FJ.(2017). Molecular Epidemiology of *Leptospira* Serogroup Pomona Infections Among Wild and Domestic Animals in Spain. *Ecohealth*, 14(1): 48-57.
8. Bercovich Z. (1986). The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle and pigs in the Netherlands, En: Ellis WA, Little TWA. (Eds.) *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, Nijhoff, p. 185-191.
9. Bolin C. (2000). *Leptospirosis*, En: C. Brown, C. Bolin (Eds.) *Emerging Diseases of Animals*. Washington DC, ASM Press, 185-200.
10. Bolin C. (2003). *Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis*. *Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference March 12-14, Reno, NV* 155-159.
11. Bolin CA, Alt DP. (2001). Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res*, 62(7): 995-1000.

12. Bolin CA, Zuerner RL. (1996). Correlation between DNA restriction fragment length polymorphisms in *Leptospira interrogans* serovar pomona type kennewicki and host animal source. *J Clin Microbiol*, 34(2): 424-425.
13. Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. (1971). Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev. Urug. Pat. Clín. Microbiol.*, 9: 186-194.
14. Caffarena RM, Agorio M. (1965). Comprobaciones serológicas de Brucelosis, Fiebre “Q” y Leptospirosis en Bovinos del Uruguay. *Gaceta Veterinaria (Buenos Aires)* 27 (182): 377 y 387.
15. Cameron CE. (2015). Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. En: Adler, B. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*. 387: 21-42.
16. Campos AP, Higino Miranda DF, Soares Rodrigues GH, da Silva Carneiro Lustosa M, Chaves Martins GH, Bezerra Barradas Mineiro AL, Castro V, Santos Azevedo S, Medeiros de Sousa Silva SM. (2017). Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. DOI 10.1007/s11250-017-1255-2.
17. Carmona-Gasca CA, León Lara L, Castillo-Sánchez LO, Ramírez-Ortega JM, Ko A, Luna Palomera C, de la Peña-Moctezuma A. (2011). Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. *Vet. Mex.*, 42(4): 277-288.
18. Chideroli RT, Pereira UP, Gonçalves DD, Nakamura AY, Alferi AA, Alferi AF, Freitas JC. (2016). Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genet. Mol. Res* 15(1): gmr.15018473
19. Cortese VS, Ramsey D, Behan S, Bryson L, Galvin JE, Lucas MJ, Penka DR. (2007). Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* Serovar hardjo infection in experimentally infected cattle. *Vet Therapeut*, 8(3): 201-208.
20. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003898. doi:10.1371/journal.pntd.0003898.
21. Cousins DV, Robertson GM, 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. *Vet. Microbiol.*, 10: 439-450.

22. Draghi MG, Brihuega B, Benítez D, Sala JM, Biotti GM, Pereyra M, Homse A, Guariniello L. (2011). Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43: 42-44.
23. Dutra F. (2013) Epidemiología y control de la leptospirosis bovina en el Uruguay, con especial referencia en la zona Este. En: Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. *Leptospirosis*, p. 8-17. Disponible en: <http://www.academiadeveterinaria.uy/wpcontent/uploads/2017/03/Leptospirosis.pdf> 20/01/2018.
24. Easton C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Identificación de la acción de agentes infecciosos vinculados con el aborto bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República, Uruguay, pp. 57.
25. Echenique L, Sosa de Caruso N. (1958) Leptospirosis Bovina. *Anales de Facultad de Veterinaria del Uruguay*, 8: 67-76. Disponible en: <http://www.fvet.edu.uy/?q=biblioteca/anales-de-la-facultad-de-veterinaria-del-uruguay-1954-1992>. Fecha de consulta: 23/09/2015.
26. Ellis WA. (1984). Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev Vet Med*, 2: 411-421.
27. Ellis WA. (1986). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. En: *The Present State of Leptospirosis. Diagnosis and Control*. Ellis W.A. & Little T.W.A., Dordrecht, Nijhoff, p. 13-24.
28. Ellis WA. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 10(2): 463-478.
29. Ellis WA. (2012). Leptospirosis. En: Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine*. 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, p. 770-778.
30. Ellis WA. (2015). Animal Leptospirosis. En: Adler, B. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*, 387: 99-137.
31. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. Medisci Press, Melbourne, pp. 272.
32. Faine S. (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis*. 2nd ed. World Health Organization, Geneva, pp. 171.
33. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. (2016) What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic

analysis of the genus *Leptospira*. PLoS Negl Trop Dis 10(2):e0004403. Epub 2016/02/20.

34. Garristen MJ, Koopmans MJ, Olyhoek, T. (1993). Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in experimentally infected cows. *Vet Microbiol*, 38: 129-138.
35. Gaumont R, Trap D. (1986). Leptospirosis in domestic animals in France: current situation, En: Ellis WA, Little TWA. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Dordrecht, Nijhoff, p. 179-184.
36. Gil AD. (2001). Monitoreo sanitario en rodeos lecheros en Florida. En: Aspectos Sanitarios y Reproductivos en Bovinos. Seminario JICA/DILAVE Miguel C. Rubino. Treinta y Tres (Uruguay), p. 47-56.
37. Grooms D. (2006) Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66: 624–628.
38. Haake DA, Levett PN. (2015) Leptospirosis in Humans En: Adler, B. Current Topics in Microbiology and Immunology: *Leptospira* and Leptospirosis. 387: 99-137.
39. Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Pestana C, Lawson- Ferreira R, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2014) Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. Short communication. *Vet Res Commun*. 38: 81-85.
40. Hamond C, Pestana CP, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2015). Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiol Infect*. 144(1): 72-75.
41. Hathaway SC. (1981) Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. *N Z Vet J*, 29 (7): 109-112.
42. Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods* 84: 1-7.
43. Hodges RT & Day AM. (1987). Bovine leptospirosis: The effects of vaccination on serological responses as determined by complement fixation and microscopic agglutination tests. *N Z Vet J* 35(5): 61-64.
44. Landis JR, Koch GG. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.

45. León AGZ. (2009). Factores de riesgo asociados a leptospirosis en hatos bovinos de Pereira, 2002–2005, *Investig andina*, 111(19): 109-117.
46. Levett PN. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 14(2): 296-326.
47. Libonati H, Pinto PS, Lilenbaum W. (2017). Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. *Microb Pathog* doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.001.
48. Licoff N, Koval A, López S, Margueritte J, Mejía M. (2008). Brote de leptospirosis en feed lot: descripción del caso, confirmación diagnóstica y medidas de control implementadas. *Veterinaria Argentina*, 25(250):749-755.
49. Lilenbaum W, Martins G. (2014) Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transbound Emerg Dis* 61 (1): 63-68.
50. Lilenbaum W, Vargas R, Brandao FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. (2008). Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 69: 837-842.
51. Mackintosh C. (2014). Leptospirosis en bovinos y control de la enfermedad en Nueva Zelanda. XLII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, 82-91.
52. Manual Terrestre de la OIE (2014). Leptospirosis. Capítulo 2.1.9. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.09_Leptospirosis.pdf. Fecha de consulta: 19/05/2015.
53. Martins G, Lilenbaum W. (2017). Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res Vet Sci* 112: 156-160.
54. Martins G, Loureiro AP, Hamond C, Pinna MH, Bremont S, Bourhy P, Lilenbaum W. (2014). First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol Infect*, 143(7):1538-1541.
55. Mederos R, Casas Olascoaga R. (1959). Leptospirosis en perro. En: *Anales de Facultad de Veterinaria del Uruguay*, 9: 171-192 Disponible en: <http://www.fvet.edu.uy/?q=biblioteca/anales-de-la-facultad-de-veterinaria-del-uruguay-1954-1992>. Fecha de consulta: 23/09/2015.
56. Méndez C, Benavides L, Esquivel A, Aldama A, Torres D, Gavaldón D, Meléndez P, Moles L. (2013). Pesquisa serológica de leptospira en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noreste de México, *Revista Salud Animal*, 35(1): 25-32.

57. Meny P, Menéndez C, Quintero J, Hernández E, Ríos C, Balassiano IT, Nunes dos Reis Trindade C, Magalhães Vital-Brazil J, Mendes Varela Ramos T, Ashfeld N, Feble C, Avila E, Schelotto F, Varela G. (2017). Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Rev Inst Med Trop, São Paulo*, p. 59-79.
58. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 30(9): 2219-2224.
59. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. (2001). Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and T Lymphocytes. *Infect Immun* 69(12): 7550-7558.
60. Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, et al. (2002). Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun* 70(11): 6147-6157.
61. Nervig RM, Garrett LA. (1979). Use of Furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am J Vet Res* 40(8): 1197-1200.
62. Otaka DY, Martins G, Hamond C, Penna B, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet Rec*, 170: 338.
63. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78: 1-8.
64. Picardeau M. (2013) Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, 43:1-9.
65. Pinto PS, Loureiro AP, Penna B, Lilenbaum W. (2015). Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trop*, 149: 163-167.
66. Pinto PS, Pestana C, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2017). Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggests a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. *Acta Trop* <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
67. Pritchard DG. (1986). National situation of leptospirosis in the United Kingdom, En: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.). Present state of leptospirosis diagnosis and control. Dordrecht, Nijhoff, p. 221-233.

68. Pritchard G. (2001). Milk antibody testing in cattle. In Pract, 23: 542-548.
69. Puche R, Ferrés I, Caraballo L, Rangel Y, Picardeau M, Takiff H, Iraola G. (2017). *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. Int J Syst Evol Microbiol, 68: 513-517, doi:10.1099/ijsem.0.002528.
70. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). Leptospirosis. En: Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W. Medicina Veterinaria: tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a. ed., Madrid, McGraw-Hill, I: 1150-1168.
71. Repiso 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.
72. Repiso MV, Olivera MA, Herrera B, Silva M, Guarino H, Núñez A, Osawa T, Fernández L, Bañales P, Gil A. (2002). Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. Seminario de Actualización Técnica. INIA, Serie 228: 57-70
73. Ribeiro Rocha B, Narduche L, Salde Oliveira C, Martins G, Lilenbaum W. (2017). Molecular demonstration of intermittent shedding of *Leptospira* in cattle and sheep and its implications on control. Ciencia Rural, 47(8): 1-4.
74. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, Picardeau M. (2008). Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology 154: 1309-1317.
75. Rosa R. (2013). Epidemiología de la leptospirosis en Uruguay. En: Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. Leptospirosis, 3-7. Disponible en: <http://www.academiadeveterinaria.uy/wpcontent/uploads/2017/03/Leptospirosis.pdf> 20/01/2018.
76. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. (2006). Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J Clin Microbiol, 44(11): 3954-3962.
77. Salgado M, Otto B, Sandoval E, Reinhardt G, Boqvist SA. (2014). Cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile, BMC Vet Res, 10: 126.

78. Sarmiento AMC, Azevedo SS, Morais ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, Miraglia F, Vasconcellos SA. (2012). Brazil in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of leptospirosis in cattle herds in eight Brazilian states. *Pesqui Vet Bras*, 32(7): 601-606.
79. Schelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifrano S, Flores K, Pardo L, Parada D, Filippini M, Balseiro V, Geymonat, JP, Varela G. (2012). A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: An unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop, Sao Paulo*, 54 (2): 69-75.
80. Schelotto F, Hernández E, Varela G, Del Monte A, Meny P, González S, Ifrán S, Flores K, Pardo L, Filippini M, Parada D, Geymonat JP.(2013). Leptospirosis humana como zoonosis y su control. En: Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. *Leptospirosis*, 45-58. Disponible en:<http://www.academiadeveterinaria.uy/wpcontent/uploads/2017/03/Leptospirosis.pdf> 20/01/2018.
81. Schonberg A, Brem S, Staak C, Kampe U. (1986). Leptospirosis in the Federal Republic of Germany. Preliminary results of a 1984 animal investigation program, En: Ellis WA, Little TWA. (Eds.) *Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, Nijhoff, p. 205-209.
82. Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney BG. (1994). A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. *Aust Vet J* 71(9): 290-294.
83. Suanes A. (2013). Leptospirosis bovina: enfermedad, epidemiología y diagnóstico serológico. En: Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. *Leptospirosis*, 18-25. Disponible en: <http://www.academiadeveterinaria.uy/wpcontent/uploads/2017/03/Leptospirosis.pdf> 20/01/2018.
84. Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpaboon R, Hoffmaster AR, Day NPJ, Peacock SJ. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human Leptospirosis in Thailand: a case-control study. *Plos. One*, 6 (1) e16236.
85. Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Picardeau M, Goarant C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom*, 4 doi: 10.1099/mgen.0.000144.
86. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. (2002). Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect*, 128(1): 29-36.

87. Vallée E, Ridler AL, Heuer C, Collins-Emerson JM, Benschop J, Wilson PR. (2016). Effectiveness of a commercial leptospiral vaccine on urinary shedding in naturally exposed sheep in New Zealand. *Vaccine*, 35(9): 1362-1368.
88. Van Balen J, Hoest SA, D'Pool G, Gil M, Escalona F, Díaz D. (2009). Análisis retrospectivo de las pruebas diagnósticas de leptospirosis bovina procesadas en la unidad de investigación y diagnóstico de leptospirosis de la Universidad del Zulia, 1998-2001, *Revista Científica*, 19(6): 598-606.
89. World Health Organization. (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667>.
90. World Health Organization. (2011). Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44588/9789241501521_eng.pdf;jsessionid=686801656C45E97EFB8F9610CBEC53F0?sequence=1.
91. Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol*, 18(4): 684-691.

12. ANEXO I

Cepas de referencia de *Leptospira spp.* utilizadas como antígenos para la titulación de anticuerpos de sueros bovinos, mediante prueba de aglutinación microscópica.

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

13. ANEXO II

Antisueros de referencia utilizados para la determinación de serogrupo en los aislamientos de *Leptospira spp.* obtenidos mediante prueba de aglutinación microscópica.

Antisuero	Serogroup	Serovar	Strain
1	Australis	Australis	Ballico
2	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	Bataviae	Argentiniensis	Peludo
4	Canicola	Portlandvere	MY 1039
5	Ballum	Castellonis	Castellon 3
6	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	Grippotyphosa	Grippotyphosa type Moskva	Moskva V
8	Sejroe	Hardjo type Bovis	Sponselee
9	Hebdomadis	Goiano	Bovino 131
10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
11	Panama	Panama	CZ 214
12	Semarang	Patoc	Patoc I
13	Pomona	Proechimys	1161 U
14	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	Sejroe	Sejroe	M 84
16	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
17	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
18	Celledoni	Celledoni	Celledoni
19	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	Mini	Mini	Sari
21	Sarmin	Rio	Rr 5
22	Shermani	Shermani	1342 K
23	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
24	Louisiana	Louisiana	LSU 1945

14. ANEXO III

Número de sueros positivos a MAT y orinas positivas a PCR, cultivo y aislamiento de los 44 muestreos de bovinos.

Código	Prop.+MAT	Prop.+PCR	Prop.+Cultivo	Prop.+Aislam.
LXXIP	11/19=0,578	16/19=0,842	1/19=0,052	1/19=0,052
LXXXIVP	16/20=0,800	16/20=0,800	11/20=0,550	8/20=0,400
LXXXVIIP	4/19=0,210	15/19=0,789	1/19=0,052	1/19=0,052
XLVIIP	17/18=0,944	10/19=0,526	2/19=0,105	2/19=0,105
XIXTT	16/30=0,533	10/19=0,526	2/19=0,105	0/19=0
XXIXP	6/20=0,300	10/20=0,500	1/20=0,050	1/20=0,050
XXIIP	35/37=0,945	16/37=0,432	7/37=0,189	6/37=0,162
XLVIP	3/19=0,157	7/19=0,368	0/19=0	0/19=0
XLIVP	12/19=0,631	7/19=0,368	0/19=0	0/19=0
XXXVIIP	8/20=0,400	7/19=0,368	0/19=0	0/19=0
CM	6/19=0,315	6/19=0,315	0/19=0	0/19=0
XIM	10/14=0,714	5/16=0,312	3/16=0,187	1/16=0,062
LIVM	1/19=0,052	5/19=0,263	0/19=0	0/19=0
LXXIIIM	4/12=0,333	0/19=0	0/19=0	0/19=0
XLP	7/19=0,368	4/19=0,210	0/19=0	0/19=0
XLVP	7/19=0,368	4/20=0,200	2/20=0,100	1/20=0,050
VIIIP	6/19=0,315	3/19=0,158	2/19=0,105	2/19=0,105
XLIXP	7/19=0,368	3/19=0,157	1/19=0,052	0/19=0
XXXVP	2/19=0,105	2/19=0,105	0/19=0	0/19=0
LXVIIP	11/19=0,578	2/19=0,105	0/19=0	0/19=0
LXXXVP	10/19=0,526	2/19=0,105	1/19=0,052	0/19=0
XXIVP	3/19=0,157	2/19=0,105	1/19=0,052	0/19=0
IIP	17/39=0,435	4/39=0,102	0/39=0	0/39=0
XXVIIIIP	11/21=0,523	2/21=0,095	0/21=0	0/21=0
LXIIIM	16/18=0,888	1/18=0,055	0/18=0	0/18=0
XIIIP	18/39=0,461	1/19=0,052	1/19=0,052	1/19=0,052
XLVIIM	2/19=0,105	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0
XXXIIIM	10/20=0,500	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0
XXTT	9/19=0,473	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0
XVIIIITT	5/19=0,263	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0
XLIM	16/27=0,592	1/27=0,037	0/27=0	0/27=0
LXIIIM	4/20=0,200	0/20=0	0/20=0	0/20=0
XVTT	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0	0/19=0
CXXM	17/19=0,894	0/19=0	0/19=0	0/19=0
IVP	4/19=0,210	0/19=0	0/19=0	0/19=0
LIXP	7/19=0,368	0/19=0	1/19=0,052	1/19=0,052
LXIM	9/17=0,529	0/17=0	0/17=0	0/17=0
LXIXP	3/37=0,081	0/19=0	0/19=0	0/19=0
CXXIM	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0	0/19=0
XXXVIP	0/18=0	0/18=0	0/18=0	0/18=0

Código	Prop.+MAT	Prop.+PCR	Prop.+Cultivo	Prop.+Aislam.
XIIITT	7/19=0,368	0/19=0	0/19=0	0/19=0
XCIVM	4/19=0,210	0/19=0	0/19=0	0/19=0
CXM	1/19=0,052	0/19=0	0/19=0	0/19=0
XXITT	0/19=0	0/19=0	0/19=0	0/19=0

*Prop.+MAT: proporción de sueros positivos a MAT extraídos en muestreo a campo. Prop. +PCR: proporción de orinas positivas a PCR *lipL32*. Prop.+Cultivo: proporción de cultivos de orina positivos. Prop.+ aislam.: proporción de aislamientos positivos.

15. ANEXO IV

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

Short title: **Isolation of *Leptospira* strains from Uruguayan cattle**

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

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

²Unidad Mixta UMPI, Institut Pasteur de Montevideo + Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Montevideo, Uruguay

³Departamento de Bacteriología, División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Sede Central, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay

⁴Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁵División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Noroeste, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Paysandú, Uruguay

⁶División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Laboratorio Regional Este, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Treinta y Tres, Uruguay

⁷Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay

⁸Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France,

⁹Joint International Unit « Integrative Microbiology of Zoonotic Agents » IMiZA, Institut Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) / Institut Pasteur (Paris, France)

¹⁰Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France

*Corresponding authors:

E-mail: rrivero@mgap.gub.uy (RR)

E-mail: felipe@higiene.edu.uy (FS)

E-mail: frcorrea@inia.org.uy(FR-C)

E-mail: alebus@pasteur.edu.uy(AB)

[¶]These authors contributed equally to this work

[&]These authors also contributed equally to this work

[^] Membership of the Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium is provided in the Supporting Information.

Abstract

Leptospirosis is an neglected zoonosis with worldwide distribution. The causative agents are spirochete bacteria of the *Leptospira* genus, displaying huge diversity of serovars, the identity of which is critical for effective diagnosis and vaccination purposes. Among many mammalian species, *Leptospira* spp. infect cattle, eliciting acute signs in calves, and chronic disease in adult animals often leading to abortions. In South America, and including in Uruguay, beef and dairy export are leading sources of national income. Despite the strategic importance of bovine health, food safety, and bovine-related dissemination of leptospirosis to humans, extremely limited information is available as to the identity of *Leptospira* species and serovars infecting cattle in Uruguay and the South American subcontinent. We have established a multicentric consortium to isolate *Leptospira* strains from infected cattle. Here we report a 3-year study resulting in the isolation and detailed characterization of 30 strains of *Leptospira* spp., uncovering an unexpected variety of species and serovars. A combined approach of serologic and molecular typing, allowed us to identify these isolates as *L. interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki (14 strains), *L. borgpeterseni* serogroup

SejroeserovarHardjo(9strains)and*L. noguchii*(7 strains). The*L. noguchii*isolates showed remarkable phenotypic and geneticvariability, belonging to 5 distinct serogroups, including2that did not react with a large panel of reference serogrouping antisera. Approximately 20% of cattle sampled in the field were found to be shedding pathogenic *Leptospira* in their urine, uncovering a threat for public health that is being largely neglected. This reportof local *Leptospira* strains shall improve diagnostic tools and the understanding of leptospirosis epidemiology inSouth America.These strains could also be used as new components within bacterin vaccines to protect against the pathogenic*Leptospira* strains that are actually circulating, a direct measure to reduce the risk of human leptospirosis.

Author Summary

Several species of the genus *Leptospira* cause leptospirosis, a disease that is transmitted from animals to humans (zoonosis). Leptospirosis is the most extended zoonosis worldwide, with over a million human cases each year. *Leptospira* spp. infect a broad range of wildlife and domestic animals, including cattle. In several South American countries beef and dairy exportsrankamong the most important national income sources, explaining why in Uruguay cattle outnumber human population by a factor of 4. Yet, we did not know which *Leptospira* species and serovariants (serovars) circulate among Uruguayan cattle. Current serologic diagnostic methods and whole killed-cell vaccination approaches,criticallydepend on using the proper serovars, which are hugely variable in *Leptospira* spp. from different regions of the world. Through a multidisciplinary consortium effort, we now report the isolation of 40 strains of pathogenic *Leptospira* spp., 30 of which we were able to type and characterize. An unexpectedly large variation in terms of species and serovars was found. These data are extremely important: 1- to improve diagnostics by updatingthe available reference antigen panels; 2- to evaluate the efficacy of novel vaccines; and, 3- to implementefficacious bovine vaccination as a means of reducing the incidence of human leptospirosis.

Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide importance caused by pathogenic spirochetes belonging to the genus *Leptospira*[1]. It affects humans and a broad range of domestic animals and wildlife. In cattle, leptospirosis is an important

cause of reproductive failure, including abortions and stillbirths [2]. Infected bovines also constitute an active reservoir for the spread of the zoonotic disease, especially for humans in direct contact with infected animals including veterinarians, abattoir and farm workers, hunters, as well as scientists handling laboratory animals or during fieldwork [3, 4]. Domestic and wild animals are important reservoirs in rural areas, unlike urban settings where rats play a major dissemination role [5, 6]. Human infection with *Leptospira* spp. results from direct exposure if the source of infection is animal tissue, body fluids or urine, and from indirect exposure if the source is environmental, such as soil or urine-contaminated water. While the disease is endemic in many countries, it often presents as epidemic outbreaks, causing severe, sometimes fatal disease in both humans and animals [7, 8].

Since the first systematic studies in 1960-1970, serologic studies in animals have repeatedly shown high prevalence of exposure to *Leptospira* in Uruguay, with individual seropositivity in the 25-50% range, and herd prevalence figures of 50-70% [9, 10]. Leptospirosis is considered as a re-emerging bovine disease in Uruguay since 1998 [10], afterwards stricter epidemiologic surveillance policies have been adopted by governmental agencies, adding human leptospirosis to the official list of diseases of mandatory notification. Leptospirosis in Uruguay is endemic, with limited epidemic outbreaks in rural areas. The annual incidence of human leptospirosis is estimated at 0.15‰ [11], with precise figures not determined due to under-reporting and extremely scarce systematic studies in southern Latin America of morbidity/mortality burden [7]. The human disease appears to be associated with bovine infection, as well as to rainfalls and floods [11], with recent isolation efforts revealing the presence of three serovars of *L. interrogans* and two of *L. kirschneri* [12].

Despite the relevance of bovine leptospirosis as a cause of bovine abortion and infertility in Uruguay, there have been no extensive studies on the actual identities of *Leptospira* species and serovars obtained from animals in the field. There are currently no repositories of autochthonous isolates available in the public domain, thus constraining vaccine companies to the use of foreign strains as vaccine antigens. Even though Hardjo serovars have been suspected for years to be involved in bovine infection cases [2, 13], to the best of our knowledge only four *L. interrogans* and two *L. borgpetersenii* isolates belonging to this serovar have been reported in South America [14-16] obtained in Brazil and Chile. An early study also reported six Hardjo isolates in Argentina, without distinguish the species [17], and two isolates of *L.*

interrogans Hardjo were also reported, one in sheep from Brazil [18] and one in cattle from Mexico [19]. We now report the first results of a multicentric effort, over the course of 3 years, aimed at isolating pathogenic *Leptospira* strains in Uruguay, from infected cattle in the field and abattoirs. A detailed serologic and genetic characterization of such isolates uncovers a larger than expected variety of *Leptospira* species and serovars. These data will be instrumental for the design of better bacterin vaccines, as well as for improving diagnosis and epidemiologic studies in Uruguay and neighboring South American countries.

Methods

Identification of herds suspected of leptospirosis, and field urine and blood sampling. Forty-eight herds from both dairy and beef farms were sampled in this study, during a 33-month period (Jan 2015-Sep 2017). Private veterinarians who suspected the disease sent the first samples to our laboratory at the Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery. Following current protocols in Uruguay, serum samples from 12 animals from each suspected herd, were screened by the microscopic agglutination test (MAT) [20] for preexisting antibodies against *Leptospira* (S1 Table). Farm selection for subsequent sample collection prioritized those herds with presumptive diagnosis of leptospirosis (MAT titers ≥ 200 against ≥ 1 pathogenic *Leptospira* reference serogroup). Farms with recorded history of abortions, infertility or acute disease, were also prioritized. Selected farms were visited from January 2015 to September 2017, and individual blood and urine samples from 19 animals were collected (aiming for ≥ 1 seropositive animal with a 95% confidence interval, using a conservative seroprevalence figure of $\geq 15\%$ on a reference population of 1000 individuals; seroprevalence estimates from background serologic data in Uruguay are actually higher; the number of individual animals to sample was calculated with the software WinEpi (<http://www.winepi.net>). Due to logistic constraints, in a few cases the number of animals per herd was slightly higher, overall sampling a total of 963 individual animals. Individuals to be sampled in each farm were selected according to recorded history when available, prioritizing animals with clinical signs of acute disease (especially calves with rectal temperature ≥ 39.5 °C, jaundice and/or haemoglobinuria), previous antibody titers ≥ 200 by MAT, and/or history of abortions or infertility. If less than 19 animals met the latter criteria, additional animals (heifers or adult cows) from the same herd were included to

complete the required number. A questionnaire was distributed to farmers, gathering information about history of leptospirosis and recent vaccination (<12 months) in the farm.

Blood samples were collected by coccygeal venipuncture using 5 mL tubes with clot activator. Sera were then stored at -20°C. Intramuscular administration of diuretics (~150 mg furosemide, Furo R®, Ripoll) and thorough genital organ cleansing (wiping with 70% ethanol) preceded urine collection from individual animals. Approximately 60 mL of midstream urine was collected in sterile 120 mL containers (Bioset®, Medicplast).

Urine samples (100 µL) were inoculated in the field, immediately or within 2 h of sample collection (for the rationale, see first section of Results), in 5 mL Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (prepared with Leptospira Medium Base EMJH [Gibco] and albumin BovoLep [Bovogen Biologicals PTY Ltd]), supplemented with 100 µg/mL 5-fluorouracil (5-FU; Sigma) [20], and transported at 4°C to the laboratory together with the corresponding blood/serum samples in Vacutainer tubes (Vacutainer®, BD-NJ, USA). In the laboratory, two serial 1:50 dilutions were made from the first urine-inoculated tube, in 5 mL EMJH medium supplemented with 5-FU (EMJH/FU), and all three dilutions were incubated at 29°C. The remaining volume of urine samples was conserved at 4°C for subsequent *lipL32* gene amplification (see below). Sera were used to determine anti-*Leptospira* titers by MAT.

Urine and blood sampling from cattle in the field were performed by professional veterinarians, respecting international recommendations for animal welfare, with approval granted by the Ethics Committee for the Use of Animals for Experimentation (Comisión de Ética en el Uso de Animales de Experimentación CEUA), DILAVE, Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca MGAP), Uruguay, according to national law #18,611.

Urine and kidney samples from abattoirs. Random samples of urine (vesical puncture) and kidneys were obtained at 22 slaughterhouses that received animals from geographic regions throughout the country. No indications of reproductive failure nor of any other health problems were recorded for slaughtered animals. Due to pipeline logistics at slaughterhouses, kidneys and urine samples did not correspond to the

same animal such that individual samples were treated as independent. Urine samples were immediately inoculated in EMJH/FU, according to the same protocol as with field samples. Kidneys were transported in 4°C-refrigerated boxes to the laboratory and processed on arrival, 2-6 hours after sampling. A fragment of approximately 10 g of tissue, was placed in a funnel and surface-sterilized by dousing with alcohol and flamed with a Bunsen burner. The tissue was then placed in a sterile stomacher bag and 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS) were aseptically added. After breaking the tissue down to a pulp in the stomacher machine, the obtained suspension was allowed to settle for 15 minutes, 250 µL of supernatant were drawn and inoculated in 5 mL EMJH/FU (called tube A). From tube A, 500 µL were transferred to a second 5 mL EMJH/FU tube (tube B), thus obtaining also a 10-fold diluted culture. Finally, a third culture was also prepared from each sample by directly inoculating 5 mL Fletcher medium with a small cylinder of kidney tissue obtained with a Pasteur pipette. All cultures were incubated at 29°C.

Culture conditions, isolation and conservation of *Leptospira* strains. In order to define a precise protocol for culture inoculation in the field after urine collection, decreasing concentrations of *L. borgpeterseni* serovar Hardjo strain Sponselee cells, ranging from 10^7 to 1 bacterium, were incubated in 1 mL filter-sterilized bovine urine. After variable times, 100 µL urine were inoculated in 5 mL EMJH for culture, and bacterial growth weekly monitored under a dark-field microscope.

For isolations, *Leptospira* cultures were incubated at 29°C and observed under dark-field microscopy weekly for up to 6 months [20]. In case of contamination by other microorganisms, the cultures were filtrated through a 0.22 µm sterile syringe filter (Millipore Corporation, MA, USA) and sub-cultured in fresh EMJH media. As soon as spirochete-like bacteria grew in specific cultures, the presence of pathogenic *Leptospira* species was assessed by PCR amplification of the *lipL32* gene (see below). Once no contamination observed, PCR-confirmed cultures were sub-cultured in EMJH media without 5-FU until exponential growth phase. *Leptospira* spp. isolates were then conserved at $\geq 10^8$ cells/mL in EMJH with 2.5% of dimethyl sulfoxide (Sigma) and flash-cooled in liquid nitrogen.

***lipL32* PCR in urine samples and positive cultures for *Leptospira*.**The *lipL32* gene was chosen as a marker of pathogenic *Leptospira* species [21-23]. PCR amplification of *lipL32* was performed using purified DNA from 10 mL of bovine urine samples. The urine was centrifuged at 10,000 g for 15 min, the pellet rinsed once with PBS pH 7.4, and total DNA was extracted with the PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen). *lipL32* PCR amplification was achieved using oligonucleotide primers *LipL32F* (5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3') and *LipL32R* (5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3') [24]. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, seeking for the expected 474 bp amplicon. Bovine serum albumin (Sigma) was added in the PCR reaction mix, 0.25 mg/mL, greatly reducing sporadic inhibitory effects of certain urine samples on the amplification reaction. An internal control was always included to quantify this potential inhibition issue, by spiking analyzed samples with 40 ng of *L. borgpetersenii* DNA. Positive amplification products were randomly chosen in a few field samples, and sequenced confirming specific amplification of *Leptospira* DNA.

This *lipL32* PCR procedure was also performed to rank bacterial cultures (prioritizing more careful follow-ups), after DNA purification from 1 mL of EMJH cultures where suspect spirochetes had been observed by dark-field microscopy.

Determination of *Leptospira* species by PCR amplification and partial sequencing of the *rrs16S* gene. DNA from *Leptospira* spp. isolates were purified from 1 mL of EMJH culture using the PureLink® Genomic DNA MiniKit (Invitrogen). Primers *LeptoA* (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') and *LeptoB* (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') were used to amplify the 5'-terminal 331 bp fragment of the *rrs16S* gene. The resulting amplicons were sequenced in both senses using internal primers *LeptoC* (Forward) (5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3') and *Rs4* (Reverse) (5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3') [25]. Sequence quality was verified with the Chromas software, and a consensus sequence was obtained using BioEdit. Consensus sequences were then compared with available sequences in GenBank using BLAST.

Multilocus variable-number tandem repeat analysis. Multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analyses were performed according to published methods [26] using five discriminatory markers for VNTR loci 4, 7, 10, Lb4 and Lb5. Purified DNA from each isolate was used to amplify the VNTR4, VNTR7 and VNTR10 loci in *L. interrogans*, and the VNTR10, VNTRLb4 and VNTRLb5 loci in *L. borgpetersenii*. The GelAnalyzer 2010a software (<http://www.gelanalyzer.com>) was used to analyze the ethidium bromide-stained agarose electrophoresis gels, in which PCR products were resolved in parallel to 100-bp DNA ladder (Thermo Scientific) as molecular weight marker. The number of repeats for each VNTR locus was determined as: number of repeats = [PCR product size (bp) - flanking region (bp)] / repeat unit length (bp).

Partial *secY* gene sequencing and analysis. The *secY* gene was partially amplified by PCR with primers *SecYF* (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') and *SecYR* (5'-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3') as described [27]. The resulting 549 bp amplicon was sequenced in both senses. The consensus sequence obtained using BioEdit and the 501 bp *secY* allele was compared with those available in PubMed, MLST (<https://pubmlst.org/leptospira>) and PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) [28] databases. The phylogenetic analyses based on *secY* sequences were performed with MEGA 6.0 software (www.megasoftware.net) using the neighbor-joining method. Phylogenetic trees were calculated using the Tamura-Neil model, and the reliability of branches was validated by generating 1000 bootstrap replicates. Based on the analysis of sequence similarities, *secY* genotypes were assigned.

Serotyping. To determine the serogroup of isolated *Leptospira* strains, MAT was used with a panel of monospecific rabbit antisera spanning 24 *Leptospira* serogroups (KIT Royal Tropical Institute, S2 Table), performed in microtiter plates, mixing equal volumes of viable leptospire with serial 2-fold dilutions of each rabbit antiserum. After 2 h incubation at 37°C, agglutination of bacteria was observed under dark-field microscopy. The strain's serogroup was assigned according to the antiserum that gave highest agglutination titer. Based on the combination of results from both, serogroup determination and molecular typing (16S partial gene sequencing and VNTR analysis), a presumptive serovar was assigned to all isolates

belonging to *L. interrogans*, and *L. borgpetersenii* species, as previously described[26].

Results

Bovine urine affects *Leptospira* viability. Initial attempts to isolate *Leptospira* strains from bovine urine samples were unsuccessful. The initial protocol was based on collecting the urine from all sampled animals, and then inoculating them into the tubes with culture media. We asked whether bacterial cell viability could be compromised due to exposure to urine over time. As a first approach to address this issue, the particularly fastidious *L. borgpetersenii* serovar Hardjowas chosen[29][and references therein] to perform *in vitro* tests of viability kinetics in bovine urine. Indeed, a critical maximum time of exposure was defined at less than 2 h (S3 Table), above which subsequent isolation success rates decreased significantly. Although it cannot be ruled out that other serovars might behave differently, based on these observations, all urine samples were inoculated in the field within 2 h of collection, resulting in successful isolations.

PCR screening of urine samples is key to prioritize culture follow-up toward isolation. A second logistic challenge for isolation efforts from urine samples, was the high number of cultures subject to follow-up under dark-field microscopy. PCR amplification of *Leptospira lipL32* gene was optimized on bovine urine, eventually resulting in a robust method to prioritize cultures (Fig 1), identifying those samples that proved positive for pathogenic *Leptospira* spp. A strong inhibitory effect on *lipL32* PCR amplification was frequently observed, dependent on the urine sample (Fig 1A). This sample-dependent inhibition issue was solved by washing the bacterial pellet obtained after urine centrifugation with PBS pH 7.4 (Fig 1B), and then adding bovine serum albumin in the PCR mix (Fig 1C). The sensitivity of this PCR method was ≥ 100 *Leptospira* cells, estimated by spiking known amounts of bacteria to sterile urine samples (data not shown). Specificity was assessed confirming a positive reaction with relevant serovars of pathogenic *Leptospira* species (*L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. noguchi*), while undetectable with non-pathogenic *Leptospira* (*L. biflexa*) nor with unrelated species (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp.).

Fig 1. Screening of pathogenic *Leptospira* spp. in urine samples by PCR amplification of the *lipL32* gene.

(A) PCR amplification of the *lipL32* gene, showing on the left side products obtained from 10 mL of urine without previous washing of the pellet, and on the right side the inhibition controls using pure DNA spiking. (B) Same as (A), except that the urine pellets on the left side were previously washed with PBS pH 7.4. (C) Same as (A) and (B), except that on the left side of the ladder urine pellets were previously washed with PBS pH 7.4 and BSA was included in the PCR mix. Asterisks show PCR reactions with total inhibition. (D) Typical *lipL32* amplification results, using optimized conditions as in (C), from randomly chosen urine samples collected in the field. (E) Corresponding inhibition controls for panel (D).

Using this screening strategy, the presence of pathogenic *Leptospira* spp. DNA was confirmed in 193 urine samples, indicating that ~20 % (193/963) of all studied animals were excreting pathogenic *Leptospira* in their urine (Fig 1D and E). False positive results from collected samples are highly unlikely, considering that *lipL32* is only present in the genomes of pathogenic *Leptospira* species [21], that no detectable amplification was observed with non-specific bacteria, and that randomly chosen amplicons from bovine urine samples confirmed 100% sequence identity with *Leptospira lipL32*. Following up with this approach at the herd level, 77 % of the farms (37/44) that were studied, harbored ≥ 1 animal(s) excreting pathogenic *Leptospira*.

Isolation of native strains of pathogenic *Leptospira* spp. infecting cattle. The sampling strategies, as detailed in Methods, were chosen to maximize the odds of isolating local strains of pathogenic *Leptospira* spp. from infected cattle. A two-pronged approach was followed: i- active and directed sampling in the field, at farms with suspicion of *Leptospira* infection; and, ii- random postmortem sampling of animals at slaughterhouses.

Field sampling. A total of 48 farms representing both beef and dairy cattle herds were visited from January 2015 to September 2017. They were distributed in 14 out of the 19 geographic departments in which the Uruguayan territory is divided. A total of 963 urine samples were collected and subjected to bacterial culture

attempts and *lipL32* PCR screening. On average, *Leptospira* growth was detected by dark-field microscopy on cultures after 28 days (range 7-56 days).

Cultures that showed suspect bacteria, were subjected to *lipL32* PCR amplification, ultimately identifying 42 positive cultures from independent urine samples. However, and considering that 193 urine samples were positive by PCR screening, an estimated recovery rate of 21.7% (42/193) positive cultures from urine samples was achieved. Overall, we have obtained 31 pure cultures of *Leptospira* spp. (Table 1) showing that the rate of success in isolating these bacteria from positive cultures was close to 73%.

Sampling at abattoirs. A total of 288 kidneys and 289 urine samples (representing 577 individual animals) were collected at slaughterhouses. According to the origin of slaughtered animals, all 19 departments of the country were included. 18 positive cultures of *Leptospira* were identified by dark-field microscopy and PCR amplification (*rrs16S* and *lipL32* genes), from which 9 isolates were eventually obtained, 3 from urine and 6 from kidney samples (Table 1).

Identification of autochthonous pathogenic *Leptospira* strains. Overall, forty strains of pathogenic *Leptospira* were isolated from cattle along the course of this study. Thirty of these were thoroughly characterized by combining serologic and molecular methods (Table 1), the remaining 10 isolates are currently being typed. Among the 30 characterized strains, 23 were isolated from cows or heifers in the field, 6 from adult carcasses at abattoirs, and 1 from a calf with signs of acute leptospirosis (Table 1).

Table 1. Identification of autochthonous *Leptospira* spp. isolates by combining serologic and molecular approaches.

Isolate number	Department	Source	Year of isolation	Species (by 16S <i>rrs</i>)	VNTR ^c (repeats profile)	Serogrouping (by MAT)	Presumptive serovar (by 16S <i>rrs</i> + VNTR + MAT)	<i>sec Y</i> (genotype)
IP1507003	Paysandú*	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509008	Canelones**	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509009	Canelones**	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1509010	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512011	Paysandú*	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512014	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512015	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1512016	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1603018	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-0-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1609022	Artigas***	Urine	2015	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1610023	Lavalleja	Urine ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	5-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1611026	Paysandú****	Urine	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1703028	Paysandú	Urine ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1703029	Paysandú	Kidney ^a	2016	<i>L. interrogans</i>	4-1-10	Pomona	Kennewicki	A
IP1506001	Canelones**	Urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1509005	Salto*****	Urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1509006	Salto*****	Urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1512013	Salto*****	Urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1605020	Canelones**	Urine	2015	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-5	Sejroe	Hardjo	B
IP1704030	Treinta y Tres*****	Urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1704031	Treinta y Tres*****	Urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-4-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1708034	Paysandú	Urine	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1708036	San José	Kidney ^a	2017	<i>L. borgpetersenii</i>	1-5-4	Sejroe	Hardjo	B
IP1512017	Florida	Urine ^b	2015	<i>L. noguchii</i>	ND	NA	ND	C
IP1605021	Salto	Urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Pyrogenes	ND	D
IP1611024	Artigas	Urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Australis	ND	E
IP1611025	Paysandú****	Urine	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	D
IP1703027	Durazno	Urine ^a	2016	<i>L. noguchii</i>	ND	NA	ND	F
IP1705032	Paysandú	Urine	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	F
IP1708035	Rocha	Kidney ^a	2017	<i>L. noguchii</i>	ND	Autumnalis	ND	G

*, **, ***, ****, ***** : isolates obtained from animals in the same farm (indicated with equal number of asterisks)

^a: samples collected at abattoirs

^b: sample from a calf with clinical signs of acute leptospirosis

^c: the number of repeats for the VNTR4, VNTR7 and VNTR10 alleles are reported for *L. interrogans*; whereas for *L. borgpetersenii*, they correspond to the VNTR10, VNTRLb4 and VNTRLb5 alleles

NA: no detectable agglutination against any of the 24 serogroup-specific antisera included in the reference panel

ND: not determined

CONFIDENTIAL

The *Leptospira* species were determined by PCR amplification and partial sequencing of the 16S rRNA gene (*rrs*). Three different pathogenic species were thus identified (Table 1): *L. interrogans* (n=14), *L. borgpetersenii* (n=9) and *L. noguchii* (n=7).

Serogrouping of isolates was performed by MAT with a collection of 24 rabbit antisera against reference pathogenic serovars. All the *L. interrogans* isolates corresponded to serogroup Pomona, and all the *L. borgpetersenii* strains, to serogroup Sejroe. In contrast, the *L. noguchii* isolates showed agglutination titers against a broader variety of serogroups, including Pyrogenes (n=1), Australis (n=1), Autumnalis (n=3), and two *L. noguchii* isolates did not agglutinate with none of the reference antisera used.

Taking into account the identification of species and serogroup, together with the VNTR profiles, it was possible to assign all 14 *L. interrogans* strains to serovar Kennewicki, and the 9 *L. borgpetersenii* isolates to serovar Hardjo (Table 2). The serovar of the *L. noguchii* isolates could not be predicted, given that current VNTR profiling tables do not allow yet for serovar assignment of this species.

Six *L. interrogans*, five *L. borgpetersenii* and one *L. noguchii* strains, were isolated from farms with no history of vaccination. Among such animals, MAT agglutination titers against reference strains were in most cases lower than 200 (considered as non-reactive) and only in five animals these titers reached 400 (Table 2). Most of the isolates recovered from herds with no history of vaccination, belonged to the homologous serogroup as shown by the seroreactivity data (strains IP1507003, IP1509008, IP1509009, IP1509010, IP1512011, IP1512014, IP1509005, IP1509006, IP1512013 and IP1708034). A heterologous serogroup was identified only in two isolates (IP1506001 and IP 1605021), corresponding respectively to *L. borgpetersenii* and *L. noguchii* strains.

Table 2. MAT seroreactivity against reference *Leptospira* antigens and history of vaccination in cattle with positive culture of pathogenic *Leptospira* spp.

Strain #	Species identification	Serogroup / presumptive Serovar identification	Seroreactivity of the animal from which the isolate was obtained (serogroup/titer)	Seroreactivity of other animals in the same herd* (serogroup)	History of vaccination in the farm
IP1507003	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/200		No
IP1509008	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Nr	Pomona	No
IP1509009	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/400		No
IP1509010	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/400		No
IP1512011	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Nr	Pomona	No
IP1512014	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/400		No
IP1512015	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/6400		Yes
IP1512016	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/800		Yes
IP1603018	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/3200		Yes
IP1609022	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/1600		Yes
IP1611026	<i>L. interrogans</i>	Pomona / Kennewicki	Pomona/6400 Sejroe/1600		Yes
IP1506001	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Pomona/400		No
IP1509005	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nr	Sejroe, Pomona	No
IP1509006	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nr	Sejroe, Pomona	No
IP1512013	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nr	Sejroe, Pomona	No
IP1605020	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Sejroe/200		Yes
IP1704030	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nr	Sejroe	Yes
IP1704031	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nd	Sejroe	Yes
IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe/ Hardjo	Nr	Sejroe	No
IP1512017	<i>L. noguchii</i>	No agglutination [§] / na [¶]	Nr		NA
IP1605021	<i>L. noguchii</i>	Pyrogenes / na [¶]	Nr	Sejroe	No
IP1611024	<i>L. noguchii</i>	Australis / na [¶]	Nr	Sejroe, Pomona	Yes
IP1611025	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis/ na [¶]	Sejroe/3200		Yes
IP1705032	<i>L. noguchii</i>	Autumnalis/ na [¶]	Nr	Sejroe, Pomona	Yes

*Shown if the seroreactivity MAT titer < 200 in the animal from which the isolate was recovered; § No agglutination against the reference panel of serogrouping antisera; ¶ No molecular proxy available for *L. noguchii* serovar assignment; na: not applicable; nr: non-reactive (below cutoff MAT titer 200); nd: not done

Phylogeny of *Leptospira* isolates based on *secY* gene sequence analysis.

Genetic analysis of the 501bp *secY* allele was performed on the 30 typed isolates described in this work. Comparison to other *L. interrogans* serovar Pomona, *L. borgpeterseni* serovar Hardjo and *L. noguchii* sequences, obtained from other geographical regions and available in public databases, allowed to build a picture of related groups. The dendrogram of partial *secY* sequence analysis, uncovered three phylogenetic clades that correspond to genomospecies identified by partial 16S *rrs* gene sequencing: *L. interrogans*, *L. borgpeterseni* and *L. noguchii* (Fig 2). Only one cluster was observed for both *L. interrogans* and *L. borgpeterseni* sequences, indicating that bovine isolates from Uruguay belonging to these two species have close homology with isolates from South America (mainly from Brazil and Argentina) [30]. In contrast, *secY* sequence analysis of the *L. noguchii* isolates revealed a substantially broader diversity, with isolates grouped in two distinct clusters. The first included two isolates, from Panama and Peru. The second cluster, comprised all the *L. noguchii* isolates we are now reporting from Uruguay, as well as a number of other strains obtained from both human and animal origin in several countries of the American continent (Brazil, Nicaragua, Peru, Trinidad & Tobago, USA). Worth highlighting, the *secY* sequences of our bovine isolates IP1611024 and IP1708035, are identical to two recently reported in Brazil, respectively isolated from cattle [31] and humans [32].

Fig 2. Phylogeny of *Leptospira* spp. isolates based on *secY* gene sequence analysis. Partial sequences of the *secY* gene corresponding to 30 bovine isolates from Uruguay (named according to their strain denomination as “IP” followed by a 7-digit number) are plotted in comparison to other 29 sequences corresponding to isolates obtained elsewhere and from a variety of hosts, as indicated within parentheses. Stars indicate the known serovar for each isolate as follows: *serovar Pomona **serovar Panama ***serovar Autumnalis ****serovar Hardjo

Discussion

We are now reporting the isolation and typing of 30 native strains of pathogenic *Leptospira* spp. from infected cattle in Uruguay. This is the first systematic effort to isolate and type autochthonous *Leptospira* strains from cattle in this country, where bovine leptospirosis is a major concern as a cause of abortions and zoonotic dissemination. *L. interrogans* serovar Kennewicki (serogroup Pomona), our most frequent bovine isolate, has actually been also recovered from human patients with leptospirosis in Uruguay [12]. Successful culture from bovines has likely been boosted by optimizing field sampling protocols, especially after quantifying time-dependent *Leptospira* viability in bovine urine. PCR screening was also instrumental in prioritizing cultures, the number of which increases dramatically due to the systematic use of three culture dilutions per animal, themselves important to improve purity in some cases. Of note, 9 PCR-negative samples, of a total of 963 urine samples that were screened, eventually produced positive cultures. Two different scenarios explain such discrepancies: 8 of the 9 negative results, appeared early during our studies, eventually proved to be the result of urine inhibition, and actually triggering the optimization of our protocols (see Methods and Fig 1). Only in one sample we can strongly suggest that it is the PCR method's sensitivity that explains the divergent result. *lipL32* PCR screening is thus an instrumental strategy to prioritize culture follow-ups, albeit not leading to discarding ongoing cultures. We are now optimizing an adapted, more sensitive real-time PCR approach, even more robust for screening purposes.

Regarding important, and frequently neglected factors that can lead to success or failure in nation-wide efforts based on field sampling, it is worth highlighting the voluntary participation of farmers and private veterinarians. Early arrangements ensuring for such implications were critical logistic factors for a swift sample collection strategy and for gathering useful information about herds and individual animals.

Combined serologic and molecular approaches revealed the presence of three different *Leptospira* species. Besides the anticipated *L. interrogans* and *L. borgpeterseni* species, known to be major infectious agents in cattle [2, 33], an important number of isolates correspond to *L. noguchii*, both from field samples as well as from abattoirs. *L. noguchii* has been isolated from cattle in South America [13, 31, 32], but had never been reported in Uruguay, and extremely limited

information is currently available about its epidemiologic importance. Are *L. noguchii* strains a relevant cause of acute disease or reproductive problems in cattle? The strain that we have isolated from a calf with signs of acute leptospirosis, actually corresponds to *L. noguchii*, but more information is urgently needed in order to establish the contribution of this unanticipated species in the burden of veterinarian and human leptospirosis in South America. It is interesting to note that the isolates belonging to *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*, displayed limited variation, all corresponding to a single serovar and *secY* genotype for each of them. Namely, all fourteen *L. interrogans* strains belonged to serovar Kennewicki (serogroup Pomona), displaying *secY* genotype A. Similarly, the nine *L. borgpetersenii* isolates belonged to serovar Hardjo (serogroup Sejroe), *secY* genotype B. In stark contrast, the seven *L. noguchii* isolates uncover an unexpected variety of serogroups. We have not yet assigned definite serovar types to these *L. noguchii* strains, given that the VNTR multilocus analysis scheme has not been validated on the basis of cross-agglutinin absorption tests (CAAT) with serovar-specific antisera for this *Leptospira* species. We are currently sequencing the whole genomes for all isolates and actively pursuing direct serovar identification by CAAT for the *L. noguchii* strains (to be published elsewhere). However, it can immediately be recognized that all seven *L. noguchii* strains likely correspond to seven distinct serovars, combining the information of serogrouping and *secY* types. Two of them did not agglutinate with any of the reference antisera tested, which span 24 serogroups that cover major pathogenic *Leptospira* [34]. The other five correspond to serogroups Pyrogenes, Australis and Autumnalis, the latter including three different isolates, all three of which differ in *secY* genotypes (D, F and G). The two *L. noguchii* isolates that do not react with serogroup-specific reference antisera, revealed as yet two additional *secY* genotypes (C and F), hence likely pertaining to two disparate serovars as well.

Serogroup Pomona is one of the most common variants isolated from animals worldwide [35]. This serogroup displays important genetic diversity, as revealed by restriction endonuclease analysis (REA) [36], even within serovars. However, Pomona serovar Kennewicki REA genetic profiles show high stability among isolates from a single outbreak [37] and, interestingly, a strong correlation between specific hosts and their corresponding Kennewicki profile. Those results are consistent with our study: analyzed by *secY* allele genotyping, a high homogeneity was observed in all Pomona Kennewicki isolates from cattle, despite the broad geographic distribution of

the isolates, including those obtained in the field and from slaughterhouses. Serovar Kennewickii is recognized as an animal pathogen [38], apparently adapted to pigs as maintenance host. Even though in Uruguay domestic pigs are not usually raised together with cattle, actually a forbidden practice in dairy farms, we should not rule out wild boars or other wild animals as potential hosts for this serovar, nor an endemic cycle in domestic cattle [2].

More information is needed to evaluate the prevalence of the serovars we have isolated in the whole country, and neighboring ones in South America. Furthermore, the virulence of these strains in relevant leptospirosis models will be important evidence that must be investigated, regarding pathogenicity (e.g. mortality in the hamster model) and renal colonization (e.g. in the bovine host). Nonetheless, it is worth highlighting that we have isolated similar serovars from chronic and acute cases in the field, as well as from dead animals from abattoirs, suggesting they represent a genuine sampling of the true population distribution of infectious *Leptospira* spp. in cattle. To be conclusive, an epidemiologic study with national geographic coverage is a necessary next step.

At the individual animal level, the MAT technique correctly predicted 9 of the 11 different serogroups among our *L. interrogans* isolates. In contrast, in only one case of *L. borgpetersenii* infection, did the animal present a detectable antibody titer against serogroup Sejroe. This is likely due to low sensitivity of the MAT as known when it comes to acclimated serovars such as Hardjo in cattle [39]. The MAT did not identify any of the *L. noguchii* isolates, as these were not included within the reference antigen panel in the national diagnostics laboratories (DILAVE, Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery). This finding is important, as *L. noguchii* is a recognized pathogenic species for animals and humans [32, 40].

As a consequence of this study, the inclusion of these native strains as reference antigens for MAT diagnostics and seroprevalence epidemiologic studies, must be an immediate action. Such policies will be important to increase MAT-based diagnostics sensitivity and accuracy [41], and to improve the estimations of prevalence and incidence of bovine leptospirosis infection in the country. Furthermore, isolation and characterization of circulating *Leptospira* strains, are ongoing activities as a result of our multicentric consortium efforts. We anticipate that new variants may be discovered, achieving a more complete understanding of current diversity of *Leptospira* in South America.

A recent study of bovine *Leptospira* spp. isolates obtained from animals in slaughterhouses in Brazil, showed an important diversity in terms of species and serovars[13]. Libonati et al. report two *L. interrogans* strains belonging to serogroup Sejroe, and four different serogroups were assigned to each of the other two *L. santarosai* and *L. noguchii* species identified. Our results now demonstrate a similar diversity of bovine isolates in terms of species and serovars. We have isolated *L. borgpetersenii* serogroup Sejroestrains, although so far, no *L. santarosai* isolates nor *L. interrogans* serogroup Sejroewere recovered. Instead, we did isolate several strains of *L. interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki. With regards to *L. noguchii*, the broad range of serogroups that we have detected seems to be a shared scenario with the situation in Brazil, with Autumnalis, Australis and Pyrogenes identified in both countries (additionally, serogroup Panama has also been identified in Brazil[31]). However, two *L. noguchii* isolates could not be classified in any serogroup, failing to agglutinate with the broad panel of reference antisera that was used. These results were confirmed in three different laboratories within our consortium, including the Paris center (WHO Collaborating Center and French reference laboratory for leptospirosis). In any case, these novel serogroups are distinct from the *L. noguchii* strains so far isolated in Brazil.

It does not escape our attention that most of the serovars that we are now reporting, are not included in the vaccines currently available to the farmers. Except for *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, to the best of our knowledge neither serovar Kennewicki (*L. interrogans*) nor any of the *L. noguchii* strains, are being included in bacterin formulations that different companies produce and commercialize as bovine vaccines in South America. Bacterins confer little or no cross-protection between serovars, hence the serovars that actually circulate in each region should be included to aim for efficacious vaccines [33]. Indeed, in our study we have obtained several isolates from one herd before and after vaccination. We will now perform closer analyses of naturally exposed herds, following up the effects of vaccination at the individual level. That current vaccines might have shifted the serovar profile of currently circulating *Leptospira* strains in Uruguay, is a plausible scenario. Proper bacterin vaccination should result in herd protection. We should have thus observed lower isolation rates from vaccinated herds, but we haven't. Urine shedding of leptospires can be effectively controlled or significantly reduced in livestock, by using the correct bacterin formulations, according to recent studies with

naturally exposed sheep herds [42] or with experimental vaccination/challenge approaches in cattle[43].Significant reduction in bovine renal colonization and bacterial urinary shedding is achievedby vaccination with bacterinsthat include the infectious serovars[44], ultimately controlling endemic cycles of infection.Moreover, a systematic vaccination and surveillance program forpig and cattle leptospirosis in New Zealand, demonstrated a correlative dramatic decrease in the incidence, not only of the animal disease, but also of human leptospirosis[45]. Nevertheless,further research is neededto obtain long-lasting vaccination effects and complete protection against bacterial infection.Likely a protective cellular immune response is needed in the cattlemodel [44, 46, 47]to generate ahighly efficacious vaccine against leptospirosis, and not only the humoral response triggered by killed-cell bacterins.The latter are also known to trigger a biased response towards the serovar-specific bacterial lipopolysaccharide antigen, T-independent with lack of memory response[48].

A more thorough understanding of leptospirosis epidemiology, includingmaintenance hosts and impact in livestock production, is essential to understand and design effective control strategies for this zoonosis. Efficacy studies with currently available vaccines for bovine leptospirosis in our region is alsourgently needed. The assembly of this multicentric consortiumgathering the complementary expertise of several keyresearch and governmental institutions in Uruguay, has made possible to obtainthe first repository of *Leptospira*isolates in the public domain,most of them already typed in terms of species, serogroup and serovar.This is a major milestone in the way of controlling leptospirosis in Uruguay, with the associated far-reaching aimofreducing the risk for the human population.

Acknowledgments

We thankJulie Collins Emerson and Peter Wilson (Massey University, Palmerston North, New Zealand); and,Walter Lilenbaumand Ana Paula Loureiro (Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil), for their helpful suggestions and lively discussions. We also thank Dr. Jorge Mattos (MGAP, Uruguay) for key assistancein obtaining samples at slaughterhouses.

Supporting information Captions

S1 Table. Reference *Leptospira* strains used as antigens for antibody titration of bovine sera, by microscopic agglutination test.

S2 Table. Reference antisera used for serogroup determination by microscopic agglutination test.

S3 Table. Effect of bovine urine in *L. borgpeterseni* serovar Hardjo cell viability.

References

1. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):297-307.
2. Ellis WA. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:99-137.
3. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:65-97.
4. Benschop J, Collins-Emerson J, Maskill A, O'Connor P, Tunbridge M, Yupiana Y, et al. Leptospirosis in three workers on a dairy farm with unvaccinated cattle. *N Z Med J.* 2017;130(1462):102-108.
5. Adler B. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:1-9.
6. Millan J, Cevidanes A, Chirife AD, Candela MG, Leon-Vizcaino L. Risk factors of *Leptospira* infection in Mediterranean periurban micromammals. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(1):e79-e85.
7. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0003898. Epub 2015/09/18.
8. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global burden of leptospirosis: estimated in terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):e0004122. Epub 2015/10/03.
9. Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol.* 1971;9:186-194.
10. Repiso MV, Gil A, Bañales PM, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, et al. 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).* 2005;40(157):5-28.
11. Schelotto F, Hernandez E, Gonzalez S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, et al. A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012;54(2):69-75.
12. Meny P, Menendez C, Quintero J, Hernandez E, Rios C, Balassiano IT, et al. Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2017;59:e79.
13. Libonati H, Pinto PS, Lilenbaum W. Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. *Microb Pathog.* 2017;108:101-103.

14. Chideroli RT, Pereira UP, Goncalves DD, Nakamura AY, Alfieri AA, Alfieri AF, et al. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genet Mol Res.* 2016;15(1).
15. Cosate MRV, Sakamoto T, de Oliveira Mendes TA, Moreira EC, Regis da Silva CG, Brasil B, et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):177.
16. Salgado M, Otto B, Moroni M, Sandoval E, Reinhardt G, Boqvist S, et al. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile. *BMC Vet Res.* 2015;11:66.
17. Myers DM, Jelambi F. Isolation and identification of *Leptospira* Hardjo from cattle in Argentina. *Trop Geogr Med.* 1975;27(1):63-70. Epub 1975/03/01.
18. Director A, Penna B, Hamond C, Loureiro AP, Martins G, Medeiros MA, et al. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 9):1234-1236.
19. Carmona-Gasca CA, León Lara L, Castillo-Sánchez LO, Ramírez-Ortega JM, Ko A, Luna Palomera C, et al. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. *Vet Mex.* 2011;42(4):277-288.
20. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999. 272 p.
21. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004403. Epub 2016/02/20.
22. Galloway RL, Hoffmaster AR. Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(3):199-200.
23. Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Pestana C, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, et al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet Res Commun.* 2014;38(1):81-85.
24. Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5:28. Epub 2006/11/24.
25. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992;30(9):2219-2224.
26. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):3954-3962.
27. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(11):e1374.
28. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:595.

29. Chideroli RT, Goncalves DD, Suphoronski SA, Alfieri AF, Alfieri AA, de Oliveira AG, et al. Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. *Front Microbiol.* 2017;8:2155.
30. Hamond C, Pestana CP, Medeiros MA, Lilenbaum W. Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2016;144(1):72-75.
31. Martins G, Loureiro AP, Hamond C, Pinna MH, Bremont S, Bourhy P, et al. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol Infect.* 2015;143(7):1538-1541.
32. Silva ÉF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanzio DA, et al. *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):621-623.
33. Adler B, Moctezuma AD. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287-296.
34. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296-326.
35. Arent ZJ, Gilmore C, San-Miguel Ayanz JM, Neyra LQ, Garcia-Pena FJ. Molecular epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in Spain. *Ecohealth.* 2017;14(1):48-57.
36. Hathaway SC, Marshall RB, Little TW, Headlam SA, Winter PJ. Differentiation of reference strains of leptospires of the Pomona serogroup by cross-agglutination absorption and restriction endonuclease analysis. *Res Vet Sci.* 1985;39(2):145-150.
37. Bolin CA, Zuerner RL. Correlation between DNA restriction fragment length polymorphisms in *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki and host animal source. *J Clin Microbiol.* 1996;34(2):424-425.
38. Ellis WA. Leptospirosis. In: Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine.* 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012. p. 770–778.
39. Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: Ellis WA, Little TWA, editors. *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control.* Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1986. p. 13–24.
40. Silva EF, Santos CS, Athanzio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine.* 2008;26(31):3892-3896.
41. Pinto PS, Loureiro AP, Penna B, Lilenbaum W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trop.* 2015;149:163-167.
42. Vallee E, Ridler AL, Heuer C, Collins-Emerson JM, Benschop J, Wilson PR. Effectiveness of a commercial leptospiral vaccine on urinary shedding in naturally exposed sheep in New Zealand. *Vaccine.* 2017;35(9):1362-1368.
43. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res.* 2001;62(7):995-1000.
44. Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(4):684-691.

45. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 2002;128(1):29-36.
46. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun.* 2001;69(12):7550-7558. Epub 2001/11/14.
47. Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, et al. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun.* 2002;70(11):6147-6157. Epub 2002/10/16.
48. Adler B. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:251-272.

Figure 1

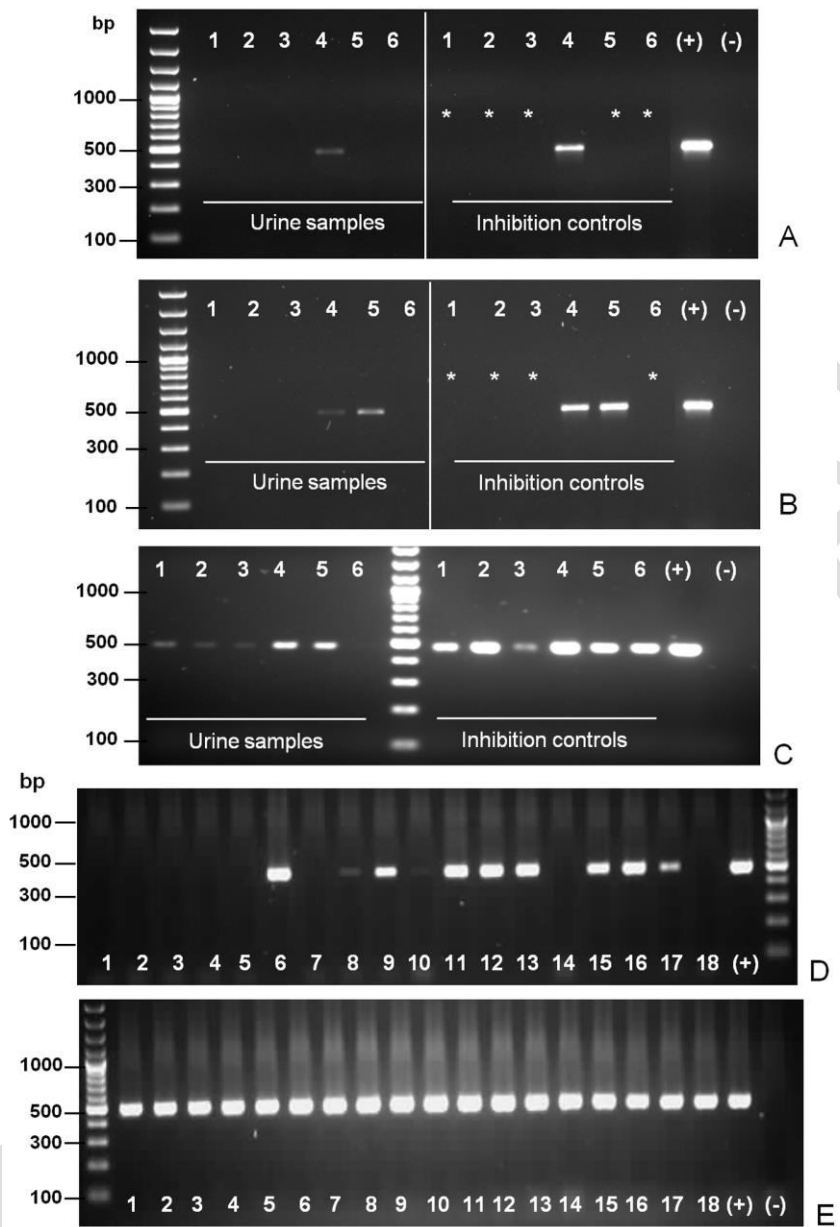
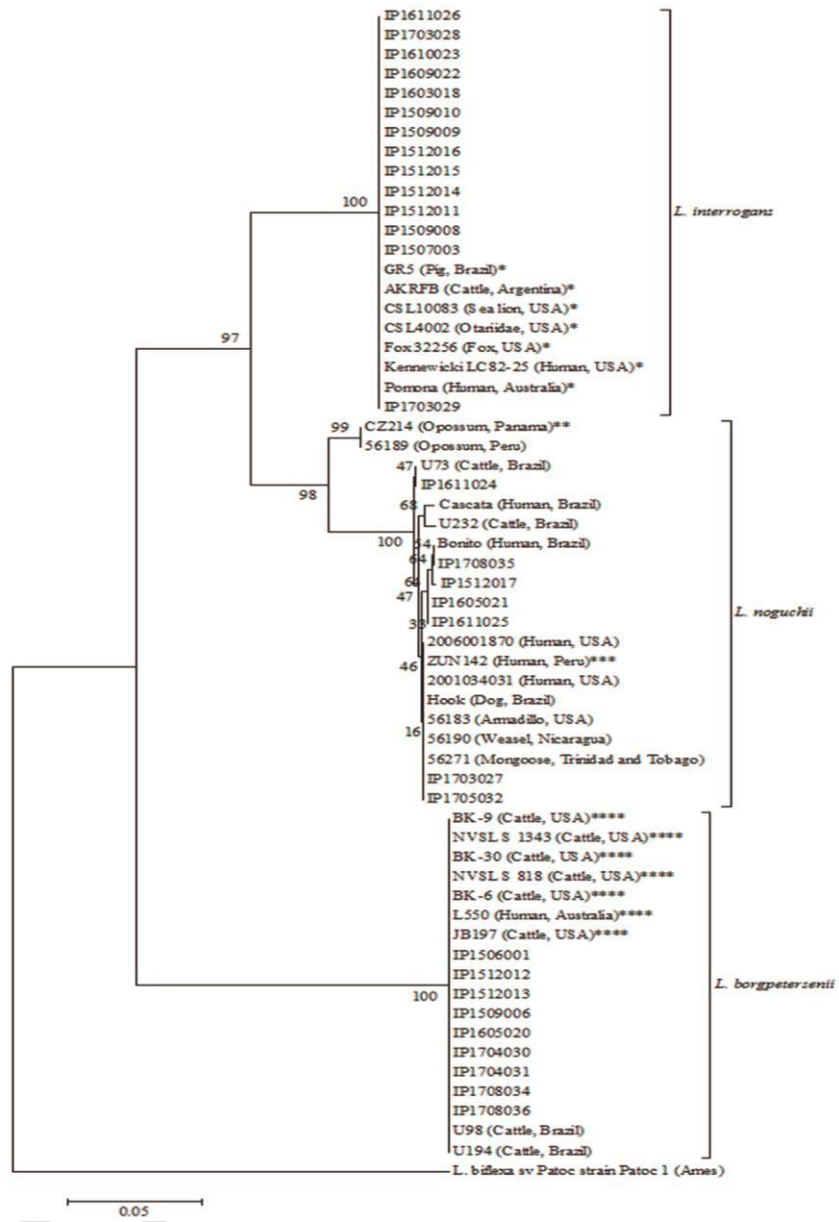


Figure 2



Supporting Information

S1 Table. Reference *Leptospira* strains used as antigens for antibody titration of bovine sera, by microscopic agglutination test.

Strain	Serogroup	Serovar
Pomona	Pomona	Pomona
Hardjo-Bovis	Sejroe	Hardjo
Hardjo-Prajitno	Sejroe	Hardjo
3705	Sejroe	Wolfii
Ictero I	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemor
Moskva V	Grippotyphosa	Grippotyphos
Hond Utrecht	Canicola	Canicola

S2 Table. Reference antisera used for serogroup determination by microscopic agglutination test.

Antisuero	Serogroup	Serovar	Strain
1	Australis	Australis	Ballico
2	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	Bataviae	Argentinesis	Peludo
4	Canicola	Portlandvere	MY 1039
5	Ballum	Castellonis	Castellon 3
6	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	Grippotyphosa	Grippotyphosa type Moskva	Moskva V
8	Sejroe	Hardjo type Bovis	Sponselee
9	Hebdomadis	Goiano	Bovino 131
10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
11	Panama	Panama	CZ 214
12	Semaranga	Patoc	Patoc I
13	Pomona	Proechimys	1161 U
14	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	Sejroe	Sejroe	M 84
16	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
17	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
18	Celledoni	Celledoni	Celledoni
19	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	Mini	Mini	Sari
21	Sarmin	Rio	Rr 5
22	Shermani	Shermani	1342 K
23	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
24	Louisiana	Louisiana	LSU 1945

S3 Table. Effect of bovine urine in *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cell viability.

Time of contact with urine before inoculation in EMJH media	Time of observation by DFM (weeks)	Evidence of growth by DFM with varying initial inocula (leptospira/mL)							
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
15 minutes	1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1 hour	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2 hours	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
6 hours	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

Members of the “Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis”

Consortium :

1- Plataforma Nacional de Investigación en Salud Animal - Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)

Franklin Riet-Correa

Martín Fraga

Federico Giannitti

Melissa Macías-Rioseco

Caroline da Silva Silveira

Cecilia Monesiglio

Yisell Perdomo

Maria Laura Casaux

2- División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP)

Alvaro Núñez

Rodolfo Rivero

Fernando Dutra

Alejandra Suanes

Ximena Salaberry
Carolina Briano
Maria Cristina Easton
Gimena Avila
Natasha Barrandeguy
Valentina Macchi
Florecia Buroni
Victor Rodriguez
Agustin Romero

3- Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Universidad de la

República (UdelaR)

Felipe Schelotto

Gustavo Varela
Paulina Meny
Clara Menendez
Natalia Ashfield
Cristina Rios
Jair Quintero
Tamara Iglesias

4- Unidad Mixta Pasteur + INIA, y Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural,

Institut Pasteur de Montevideo

Otto Pritsch

Leticia Zarantonelli
Cecilia Nieves
Camila Hamond
Alejandro Buschiazzo
Felipe Trajtenberg
Nicole Larrieux
Juan Imelio
Fabiana San Martín
Joaquín Dalla Rizza
Marcos Nieves