

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS BOVINA**

por

BARRANDEGUY TEJERA, Natasha

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.

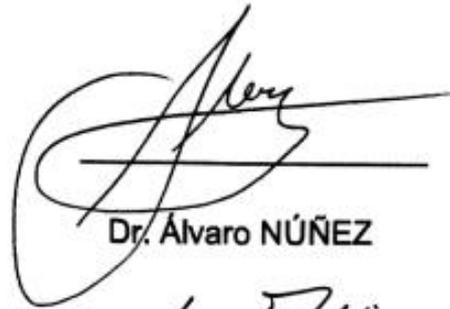
Orientación: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen
Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental.

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:



Dr. Álvaro NÚÑEZ

Segundo Miembro (Tutor)



Dr. José PIAGGIO

Tercer Miembro



Dra. Laureana DE BRUN

Cuarto Miembro (Co-tutor)

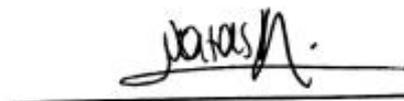


Dra. Alejandra SUANES

Fecha:

23/12/2021

Autor:



Natasha BARRANDEGUY TEJERA

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Alejandra Suanes y el Dr. José Piaggio por darme la oportunidad de realizar éste proyecto, transmitirme sus conocimientos y orientarme durante el proceso.
- A la comisión CIDEC por la financiación del proyecto.
- A DILAVE-MGAP por prestarme sus instalaciones.
- A la Dra. Ximena Salaberry y la Dra. Valentina Macchi por su colaboración.
- Al Sr. Alberto Mórtola.
- A familiares y amigos por el apoyo brindado durante toda ésta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
2. RESUMEN.....	6
3. SUMMARY	7
4. INTRODUCCIÓN.....	8
5. REVISION BIBLIOGRAFICA	10
5.1. <i>Agente Etiológico</i>	10
5.2. <i>Epidemiología</i>	12
5.3. <i>Transmisión y patogenicia:</i>	13
5.4. <i>Signos Clínicos</i>	15
5.5. <i>Leptospirosis en humanos:</i>	16
5.6. <i>Estudios Nacionales</i>	17
5.7. <i>Diagnostico</i>	17
5.7.1. <i>Métodos Directos:</i>	18
5.7.1.1. <i>Microscopia de Campo Oscuro:</i>	18
5.7.1.2. <i>Cultivo Bacteriano:</i>	19
5.7.1.3. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa:</i>	20
5.7.2. <i>Métodos Indirectos:</i>	21
5.7.2.1. <i>Aglutinación Microscópica:</i>	21
5.7.2.2. <i>Inmunofluorescencia Directa:</i>	23
6. OBJETIVOS	24
6.1. <i>Objetivos Generales:</i>	24
6.2. <i>Objetivos Específicos:</i>	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	25
7.1. <i>Ensayo experimental</i>	25
7.2. <i>A campo</i>	27
7.3. <i>Análisis estadístico</i>	28
8. RESULTADOS:	28
8.1. <i>Sensibilidad Analítica:</i>	28
<i>Índice Kappa de Cohen:</i>	31
9. DISCUSIÓN.....	33
10. CONCLUSIONES.....	35
11. BIBLIOGRAFÍA	36

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Serovares del cepario de referencia.....	25
Tabla 2. Resultados de la Sensibilidad Analítica para el medio de cultivo no selectivo (EMJH), para los Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)	28
Tabla 3. Resultado de la Sensibilidad Analítica del medio de cultivo Selectivo (EMJH+5FU) para los tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente).....	29
Tabla 4. Resultados de la Sensibilidad Analítica de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD)	30
Tabla 5. Resultados del desempeño de la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) usando como referencia la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD).	31
Tabla 6. valor del Índice Kappa de Cohen.	31
Tabla 7. Clasificación de Galton para interpretar los valores de Kappa.	32

Figura 1 Microscopia de campo oscuro (a) y Fotomicrografía (b) de <i>Leptospira spp.</i> Donde se puede apreciar su estructura delgada y espiralada con extremos en gancho (Alder y de la Pena Moctezuma, 2010).	10
Figura 2 Árbol filogenético de <i>Leptospira</i> (Alder, 2015).	11
Figura 3 Ciclo de transmisión de la leptospirosis:.....	13
Figura 4 Proceso de preparación de las diluciones seriadas en base 10 del mix de Leptospiras.	26
Figura 5 Proceso de preparación de los cultivos.	26
Figura 6 Graficas de Sensibilidad Analítica para Medio de cultivo No Selectivo, Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente).....	29
Figura 7 Grafica de la Sensibilidad Analítica para el medio de cultivo Selectivo, para los Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)	29
Figura 8 Gráfica de la Sensibilidad Analítica de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD)	30

2. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira*. Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial. Los objetivos de este estudio fueron determinar la sensibilidad analítica (SeA) de la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) y los cultivos bacteriológicos, así como comparar la prueba de microaglutinación (MAT) con la IFD. Para medir la SeA se tomaron muestras de orina y sangre de 10 animales seronegativos pertenecientes a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE). Cada una de las muestras se sembró en medio de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con y sin 5-fluorouracilo y se inoculó con *Leptospiras* pertenecientes al cepario del DILAVE, además se realizaron 7 diluciones seriadas en base 10. La prueba de IFD se realizó en todas las diluciones. La sangre y la orina para realizar MAT y IFD, fueron tomadas de rebaños con antecedentes de aborto y leptospirosis. La SeA se analizó a partir de la regresión "probit". Para medir el acuerdo entre el MAT y la IFD, se utilizó el índice Kappa de Cohen.

Las leptospiras inoculadas experimentalmente crecieron en ambos medios de cultivo, sin embargo, la SeA fue mayor con el medio de cultivo selectivo. La sensibilidad para la IFD fue de 0,70. Hubo un "pobre" acuerdo entre MAT y IFD ($\kappa = 0,17$). Para ser detectados por la prueba de IFD los animales deben eliminar concentraciones elevadas de leptospira en la orina de al menos 1×10^5 leptospiras/ml. En el momento del aislamiento, se recomienda el medio selectivo, tiene mayor sensibilidad y menos contaminación ya que las leptospiras son difíciles de cultivar y los cultivos deben ser incubados por largos períodos de tiempo.

3. SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial disease caused by pathogenic microorganisms of the genus *Leptospira*. It is a zoonotic disease of worldwide distribution. The objectives of this study were to determine the analytical sensitivity (SeA) of the direct immunofluorescence (DIF) test and bacteriological cultures as well as to compare the microscopic microagglutination test (MAT) with the DIF. To measure the SeA, negative bovines housed in the DILAVE were selected and sample. Urine and blood samples were taken from 10 animals. Each of the samples was seeded in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium with and without 5-fluorouracil and inoculated with *Leptospira* reference strain from the DILAVE, in addition 7 serial dilutions were performed on base 10. The DIF was performed at all dilutions. Blood and urine to perform MAT and DIF, were taken from seropositive herds with history of abortion and leptospirosis. The SeA was analyzed from regression "probit". To measure the agreement between the MAT and DIF, the Kappa index was used. Experimentally inoculated leptospirae grew in both culture media however the SeA was higher with the selective culture medium. The sensitivity for the DIF was 0.70. There was a "poor" agreement between MAT and IFD (kappa = 0.17). To be detected by the DIF animals must be eliminating high concentrations of leptospira in urine of at least 1×10^5 leptospiras/ml. At the time of isolation, the selective medium is recommended, it has greater sensitivity and less contamination, the leptospirae are difficult to grow and the cultures must be incubated for long periods of time.

4. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una de las zoonosis con más amplia distribución en el mundo (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Ha sido considerada por la OPS-OMS como una enfermedad reemergente junto con el dengue, el cólera, la tuberculosis y la Malaria. En tanto que, el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control) la identificó como una de las enfermedades infecciosas de particular interés (Dujardin et al., 2008), resultando en recomendaciones para la vigilancia epidemiológica más específica y la generación de medidas de control por parte de la OIE (Dufour, Moutou, Hattenberger y Rodhain, 2008).

La Leptospirosis es causada por distintas cepas patógenas que pertenecen a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*; son bacterias espiroquetas finas y móviles, aeróbicas cuya naturaleza es esencialmente acuática (Faine y Alder, 1999).

La incidencia de ésta enfermedad es mayor en los países tropicales, esto se debe especialmente a las altas condiciones de humedad y temperatura que favorecen la supervivencia de la bacteria en el ambiente, propiciando así la transmisión de la enfermedad (Levett, 2001, Bharti et al., 2003). La infección se transmite al ser humano por contacto directo con animales infectados (orina) o indirectamente a través del contacto con aguas, suelos o plantas contaminadas (Gil y Samartino, 2000).

Todas las especies de animales domésticos son susceptibles de contraer Leptospirosis. Para su transmisión, es necesaria la presencia de un portador asintomático o sintomático de la enfermedad, el que puede ser tanto un animal doméstico como un animal salvaje (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Un animal se infectará con serovares mantenidos por la misma especie, o por serovares mantenidos por otras especies de animales presentes en la zona (Ellis, 2015).

En los bovinos se evidencian principalmente problemas reproductivos como infertilidad, partos prolongados, abortos, ocurrencia de mortinatos y terneros débiles. La infección persistente del tracto reproductivo puede ser la manifestación más importante en rumiantes, principalmente cuando el serovar Hardjo está involucrado (Ellis, 1994). Es por esto, que la importancia de la leptospirosis bovina radica en el impacto de ésta en la salud pública e incluye los costos económicos del aborto, la pérdida de producción de leche y también los gastos sanitarios asociados (Faine y Adler, 1999).

Sin embargo, la leptospirosis tiende a desarrollarse de forma subclínica en la mayoría de los animales, por ésta razón las herramientas de laboratorio son fundamentales para lograr el correcto diagnóstico de la enfermedad (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010, Alder, 2015).

Las alternativas del diagnóstico de laboratorio para la leptospirosis son: examen directo de muestras sospechosas en microscopio de campo oscuro; cultivo de leptospiras a partir de muestras clínicas; detección de anticuerpos en pruebas serológicas y detección de ADN de leptospiras por técnicas de biología molecular (Faine y Adler, 1999, Bharti et al., 2003).

Dentro de las pruebas serológicas la prueba de Aglutinación Microscópica (por

su siglas en inglés MAT) desarrollada por Martin y Petit en el año 1918, es el método de referencia y cuantifica anticuerpos contra leptospirosis en el suero sanguíneo (Borg-Petersen, 1949; Borg-Petersen y Fagraeus, 1949; Watt, Alquiza, Padre, Tuazon y Laughlin, 1988; Postic, Merien, Perolat y Baranton, 2000).

Si bien es la técnica “*gold standard*” debido a su alta especificidad (99%) tiene la desventaja de presentar una baja sensibilidad, pudiendo variar ésta según el estado de la enfermedad. La misma puede ser útil para el diagnóstico de leptospirosis en determinadas situaciones (casos agudos) pero puede dificultarlo en otros, como por ejemplo en el curso crónico y subclínico de la enfermedad (OIE, 2009).

Por otro lado la técnica de Inmuno-Fluorescencia Directa (IFD) en orina de bovinos se ha empleado para el diagnóstico de *Leptospira* serovar Hardjo reportándose una sensibilidad entre 89% y 93% (Wagenaar, J., Zuerner, R.L., Alt, D., y Bolin, C.A. (2000). Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 61(3),316-320.

5. REVISION BIBLIOGRAFICA

5.1. Agente Etiológico.

El agente etiológico de la Leptospirosis es una bacteria Gram negativa aeróbica con forma espiralada (Radostis y Blood, 2002; Alder, 2014) perteneciente a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales* (Faine y Adler, 1999).

Las *Leptospiras spp.* son espiroquetas largas, delgadas, flexibles y altamente móviles, que hacen que resulte difícil su visualización mediante microscopía de luz directa, por lo que se utiliza microscopía de campo oscuro (Alder, 2015).

Las bacterias tienen un diámetro promedio de 0.1 μm , un rango de longitud de 6-20 μm , una amplitud helicoidal de 0,1- 0,5 μm y una longitud de onda 0,5 μm . (Carleton, Charon, Allender, O'Brien, 1979, Faine y Adler, 1999).

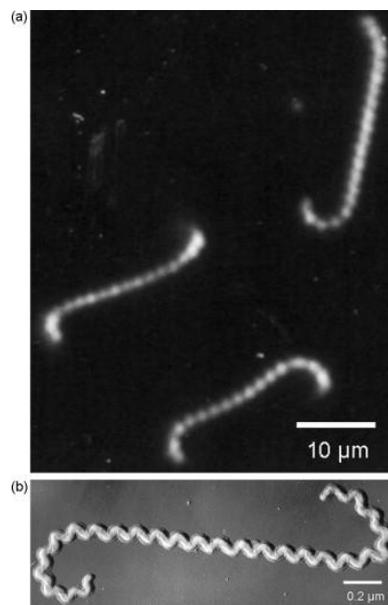


Figura 1 Microscopía de campo oscuro (a) y Fotomicrografía (b) de *Leptospira spp.* Donde se puede apreciar su estructura delgada y espiralada con extremos en gancho (Alder y de la Pena Moctezuma, 2010).

Se clasifican en tres grandes grupos según su filogenia y patogenicidad: patógenas, intermedias y saprofitas (Cequeira y Picardeau., 2009), siendo las primeras el agente etiológico de la leptospirosis (ko, Goarant y Picardeau, 2009) con fuerte predominancia de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* (aunque hay varias fuentes demostrando la patogenicidad de *L. kirschnerii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. meyeri* y *L. weilii*) (Ahmed, Anthony y Hartskeerl, 2010).

La membrana celular está formada por tres capas, la capa que se encuentra en contacto con el medio externo es la de lipopolisacáridos (LPS), la cual permite diferenciar a las leptospiras en dos especies, patógenas y no patógenas (Alder, 2015), sin embargo, la virulencia de las mismas no está dada únicamente por ésta capa de LPS, sino que la motilidad juega un rol muy importante, ya que sus flagelos le permiten a la bacteria mantener o aumentar dicha motilidad de

acuerdo a la viscosidad del medio, característica que la diferencia de otros microorganismos flagelados y le permite una mayor supervivencia en diferentes medios (Takabe, Nakamura, Ashihara y Kudo, 2013).

Hasta el momento se conocen 35 especies diferentes clasificadas en diferentes grupos filogenéticos, que se correlacionan con la virulencia de la bacteria (Vincent et al., 2019). Otro sistema de clasificación, separa a las cepas de *Leptospira* en serovares, o variantes serológicas, existen más de 300 serovares distintos de leptospirosis patógenas, y estos a su vez se agrupan en 25 serogrupos (Picardeau, 2013).

Un conjunto de serovares que comparten similitudes en el antígeno O de lipopolisacáridos de superficie es lo que se define como serogrupo (Faine y Adler, 1999).

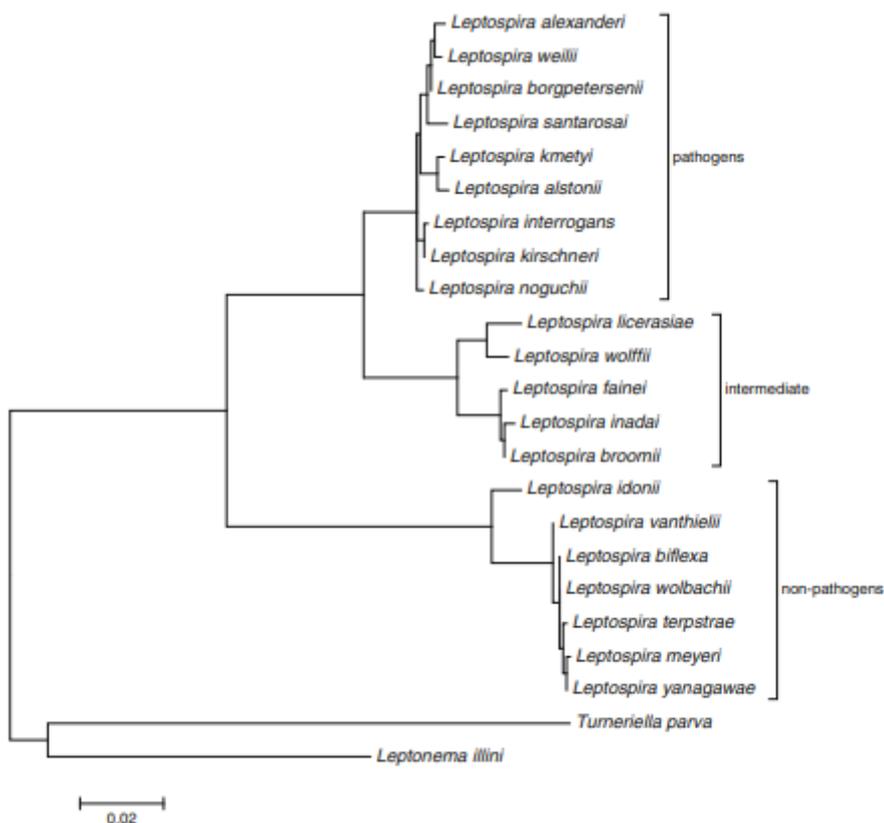


Figura 2 Árbol filogenético de *Leptospira* (Alder, 2015).

5.2. Epidemiología

La clasificación sistemática de *Leptospira spp* es esencial si se quiere entender las propiedades epidemiológicas de la enfermedad. Es sin embargo una tarea compleja, debido a una gran variabilidad de cepas patógenas, revelada por aproximaciones clasificatorias genéticas (especies) y serológicas (serovares) que no resultan ser siempre consistentes (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Se han establecido ciertas asociaciones entre determinadas serovariedades y hospederos, lo que llevo a clasificarlos en dos tipos, hospederos de mantenimiento y hospederos accidentales (Levett, 2001).

En los hospederos de mantenimiento las cepas patógenas de leptospirosis infectivas se encuentran “adaptadas” al huésped, por lo que desarrollan una infección crónica, sin sintomatología aparente (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010), dichos hospederos aseguran la circulación continua de un serovar de leptospira particular en un área geográfica (foco natural) sin necesidad de que otro huésped accidental esté involucrado (Guía OPS/OMS, 2008).

Las bacterias colonizan el tubo renal proximal de los hospederos siendo posteriormente excretadas por la orina durante largos periodos de tiempo o incluso durante toda la vida, contaminando el suelo y el agua y constituyendo la principal fuente de diseminación de la enfermedad (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010); (Guía OPS/OMS, 2008).

Cada serovar de leptospira tiende a estar asociado con un huésped de mantenimiento en particular, Canicola en perros, Bratislava en caballos y cerdos, Hardjo en bovinos, Australis y Pomona en cerdos (Ellis, O’brein, Neill y Bryso, 1986) serovar Icterohaemorrhagiae y Copenhageni en roedores (Hamond et al., 2014).

Los animales domésticos y silvestres infectados son reservorios de mayor jerarquía en la leptospirosis rural, mientras que la rata marrón, la rata negra y el ratón son el reservorio urbano de mayor importancia (Hamond et al., 2014).

Por otro lado se encuentran los hospederos accidentales como el humano, el perro, el hámster, entre otros, los cuales desarrollan la enfermedad de forma aguda, con sintomatología clínica evidente (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010); (Guía OPS/OMS, 2008).

La infección de huéspedes accidentales ocurre por contacto directo con la orina del portador (mamíferos incluidos los acuáticos y marsupiales) o indirectamente a través de un ambiente contaminado con orina infectada (Ellis et al., 1986).

Las infecciones accidentales son más comunes en climas cálidos y húmedos con saneamiento deficiente y falta de control de roedores (Ellis, 2015).

La viabilidad del microorganismo en el ambiente depende de las condiciones de pH del suelo, temperatura y humedad del medio. La bacteria es sensible a un pH inferior a 6 o superior a 8, también a temperaturas ambientales menores a 7°C o superior a 36°C (Radostis y Blood, 2002). Por otra parte, las bacterias no sobrevive en orinas acidas, por lo que animales con dietas que producen orinas alcalinas favorecen su supervivencia en el ambiente (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010).

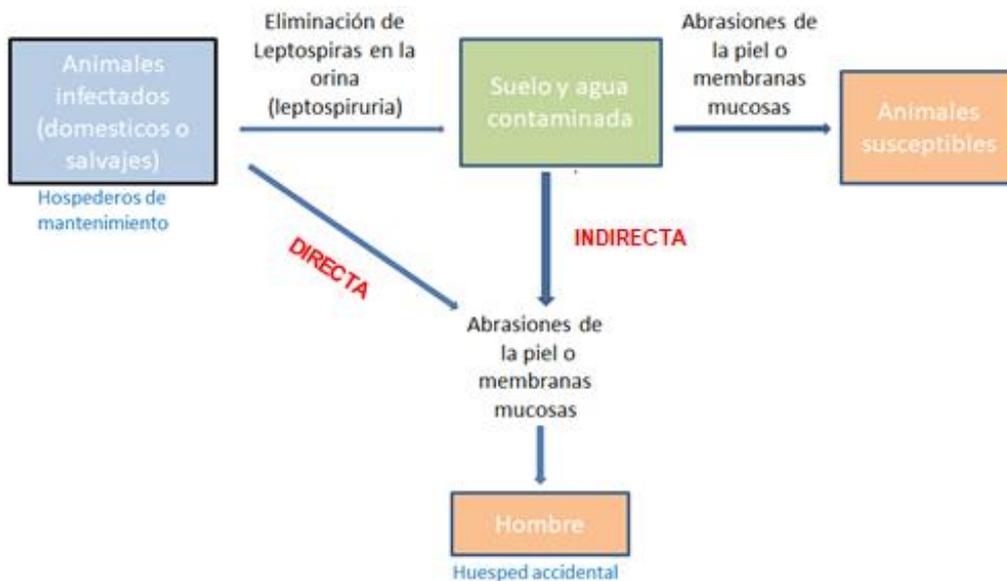


Figura 3 Ciclo de transmisión de la leptospirosis:

El ciclo incluye Hospederos de mantenimiento (cepas patógenas se encuentran adaptadas al huésped) son la principal fuente de transmisión de la enfermedad y Hospederos accidentales, como el ser humano, donde la infección se produce a raíz del contacto directo o indirecto con la orina de los animales infectados (Adaptado de Ko et al., 2009).

5.3. Transmisión y patogenia:

En general, la tendencia de que ocurra cada ruta de transmisión de la enfermedad depende de los factores demográficos, geográficos, agrícolas y ganaderos de una población particular.

Las leptospiras se transmiten principalmente a través de dos vías de exposición, ya sea por contacto directo con un animal infectado, o por contacto indirecto con medios ambientales como el suelo y el agua que están contaminados con fluidos corporales (especialmente orina) de animales infectados (Samnrot et al., 2021).

La transmisión de la infección entre hospedadores de mantenimiento se realizará independientemente de las condiciones climáticas y ambientales. Sin embargo, en el caso de la transmisión de un hospedador de mantenimiento a un hospedador accidental o entre hospedadores accidentales, será necesario que las condiciones ambientales sean las adecuadas para la supervivencia de las leptospiras fuera del hospedador (Ellis, 1984)

Las leptospiras colonizan muchas especies animales, y existe una gran variedad de huéspedes potenciales en el que pueden proliferar (Marquez, Djelouadji, Lattard y Kodjo, 2017).

Casi todos los mamíferos pueden servir como portadores de leptospiras, albergando las espiroquetas en los túbulos contorneados proximales de los riñones; explicando así por qué la orina de los animales infectados contiene una gran cantidad de bacterias y es una potencial fuente de infección (Evangelista y Coburn, 2010). Los animales portadores crónicos son fundamentales en la persistencia y la epidemiología de la leptospirosis (Alder y de la Peña 2010). Las leptospiras penetran a través de abrasiones en la piel o membranas mucosas, o a través de la piel húmeda o macerada, ingresan al torrente sanguíneo y se diseminan en diferentes tejidos si no existen anticuerpos específicos que las detengan (Ko et al., 2009, Alder, 2015). El movimiento de torsión de los flagelos periplásmicos juega un papel fundamental, permitiendo que las leptospiras ingresen al torrente sanguíneo del huésped en cuestión de minutos (Samnrot et al., 2021).

La leptospirosis bovina ocurre en todo el mundo y es el resultado de la infección por una amplia variedad de serovares, *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Hardjo bovis) es la cepa más común de este serovar mantenida por el ganado, pero *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (Hardjo prajitno) también se encuentra en el ganado en algunas partes del mundo. Ambas cepas tienen la capacidad de colonizar y persistir en el tracto genital de vacas y toros infectados, lo que sugiere que la propagación venérea puede ser también un factor de transmisión (Alder, 2015).

Se han identificado varios factores de virulencia que podrían contribuir a la patogénesis de la infección y enfermedad por *Leptospira*, incluido el LPS (que se considera un factor de virulencia general de las bacterias Gram negativas), hemolisinas, proteínas de la membrana externa y otras proteínas de superficie, así como moléculas de adhesión (Samnrot et al., 2021).

La adhesión de las leptospiras a los componentes del tejido del huésped se considera un paso inicial y necesario para la infección y la patogenia. Es probable que la unión a las células huésped y los componentes de la matriz extracelular sea necesaria para que las leptospiras puedan penetrar, diseminarse y persistir en los tejidos de los hospederos. Se ha demostrado que *L. interrogans* se une a una variedad de líneas celulares, incluidos fibroblastos, monocitos / macrófagos, células endoteliales y células epiteliales renales cultivadas in vitro (Evangelista y Coburn, 2010).

Luego de unirse a la matriz extracelular, pasa a la circulación general donde ocurre la fase de bacteriemia, diseminándose y multiplicándose en varios órganos (Radostis y Blood, 2002). Este período de bacteriemia, que puede durar una semana, comienza 1 o 2 días después de la infección. Durante este período, las leptospiras pueden aislarse de la sangre y la mayoría de los órganos del cuerpo y también del líquido cefalorraquídeo. La fase bacteriémica primaria finaliza con la aparición de anticuerpos circulantes, que son detectables generalmente después de 10 a 14 días y alcanzan un nivel máximo 3 a 6 semanas después. Un período bacteriémico secundario (después 15-26 días) rara vez se ha informado (Alder, 2015).

5.4. Signos Clínicos

Los síntomas debido a infecciones por *Leptospiras* spp. imitan las presentaciones clínicas de muchas otras enfermedades, como el dengue y la malaria (Cerqueira y Picardeau, 2009). Varias especies patógenas del género *Leptospira* pueden causar una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde una enfermedad leve, hasta una forma de enfermedad grave caracterizada por complicaciones del sistema multiorgánico que conducen a la muerte. La gravedad depende de la cepa de *Leptospira* o el serovar involucrado, el tamaño del inóculo, así como la edad, la salud y el estado inmunológico del individuo infectado (Evangelista y Coburn, 2010).

En los hospedadores de mantenimiento predomina el desarrollo de la forma crónica y subclínica de la enfermedad, mientras que en los huéspedes accidentales ocurre usualmente la forma aguda, donde pueden observarse una amplia variedad de síntomas clínicos (Faine y Adler, 1999). Cuando se determina por serovares adaptados al huésped, la enfermedad es endémica con algunos casos que ocurren de forma constante durante todo el año, en cambio, cuando la enfermedad está asociada a la forma accidental, generalmente se presenta como un brote, con un gran número de casos en un corto período de tiempo, y síntomas severos (Loureiro, Martins, Thomé, Lilenbaum, 2013).

La forma grave es poco común y generalmente se asocia con infección por cepas pertenecientes a los serogrupos considerados accidentales para los bovinos como Pomona, Icterohaemorrhagiae y Grippityphosa, principalmente en animales jóvenes, los que desarrollan una enfermedad de tipo aguda con síntomas clínicos que incluyen pirexia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, ocasionalmente meningitis y muerte. En ganado adulto pueden observarse abortos y en ganado de leche, se asocian con alteraciones en el flujo de leche (Loureiro et al., 2013, Alder, 2015).

Por otro lado, la infección por serovariedad Hardjo (ambos subtipos bovis y prajitno) en donde el bovino es considerado reservorio natural, suele ser subclínica, con la excepción de las vacas en lactación, donde puede manifestarse de forma aguda causando el "síndrome de la gota de leche" en donde se evidencia una caída repentina en la producción de leche; ubre blanda y flácida con los cuatro cuartos afectados, pirexia que puede o no estar presente, leche de color amarillento con aspecto similar al calostro, con presencia de coágulos, con un alto recuento de células somáticas y que parece estar libre de organismos causantes de mastitis comunes. El número de animales afectados puede variar del 1 al 50%, según la inmunidad del rebaño y las prácticas de manejo (Alder, 2015).

Los aspectos económicos más importantes de la leptospirosis crónica en el ganado son aborto, mortinato, parto prematuro, nacimiento de terneros débiles y con bajo peso, momificación fetal (Loureiro et al., 2013, Alder, 2015).

5.5. Leptospirosis en humanos:

La enfermedad en los seres humanos se produce a través del contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados (Levett, 2001).

Las infecciones por estas bacterias son altamente virulentas, particularmente en los países pobres. De hecho, el desarrollo de los suburbios y las pobres medidas sanitarias ha traído roedores, como las ratas, en estrecho contacto con los seres humanos. La consecuencia a la exposición de las poblaciones a los agentes de la leptospirosis aumenta el riesgo de contaminación (Marquez et al., 2017).

Las ratas son las principales portadoras de la mayoría de las leptospirosis humana, y excretan altas concentraciones de leptospiras meses después de sus infecciones iniciales. Los seres humanos, por otro lado, se consideran huéspedes accidentales, que padecen infecciones agudas, pero a veces mortales (Evangelista y Coburn 2010).

En los seres humanos, la tasa de mortalidad global es estimada en aproximadamente el 10%, con un máximo de hasta 25% en países en desarrollo. Los brotes se observan con frecuencia en regiones tropicales, particularmente en India y Brasil (Marquez et al, 2017) los factores de riesgo de leptospirosis aumentan debido a las lluvias, las inundaciones, las alcantarillas abiertas, el hacinamiento, el contacto con animales y el saneamiento deficiente (Samnrot et al., 2021).

La leptospirosis está en amplia difusión y algunas prácticas laborales, como el trabajo en arrozales, minería y trabajos en agricultura y ganadería (veterinarios, ganaderos, trabajadores de mataderos), así como ciertas actividades recreativas que implican contacto con aguas posiblemente contaminadas con orina de animales, suponen los riesgos de contagio más importantes. Las profesiones y actividades en riesgo de contraer la enfermedad de mayor a menor importancia son el personal de tambo, actividades rurales generales, veterinarios, personas en zonas bajas post inundación, personal de construcciones y viviendas con roedores (Guía OPS/OMS, 2008).

Aunque está bien establecido que la leptospirosis rara vez se transmite de una persona a otra, han demostrado que es posible que la lactancia propague la leptospira de madres infectadas a los recién nacidos (Samnrot et al., 2021).

Las infecciones humanas se caracterizan por fiebre, Insuficiencia renal o insuficiencia hepática. En algunos casos, se producen meningitis y hemorragias pulmonares (Guía OPS/OMS, 2008).

5.6. Estudios Nacionales

Los primeros estudios en el Uruguay datan de 1959 donde el Dr. Leaniz y colaboradores, realizan los primeros estudios serológicos de la enfermedad.

Recién en 1965, el Dr. Caffarena y colaboradores, realizan los primeros estudios de seroprevalencia en ganado bovino, siendo la misma de 20%.

En 1966, el Dr. Cachione y colaboradores encuentran una seroprevalencia de 24%. Posteriormente el Dr. Gil y colaboradores realizan un nuevo estudio de prevalencia en ganado bovino siendo la misma de 14%.

Repisso y col; (2001) realizan un estudio vinculado a enfermedades de la reproducción que afecta el ganado de carne, entre ellas se encontraba la leptospirosis, estimándose una seroprevalencia en ganado de carne de 38,5%.

En el año 2003, Gil realizó un monitoreo en salud animales en la cuenca sur del Uruguay (en los departamentos de San José, Colonia y Florida) encontrando que las seroprevalencias variaban según área geográfica de 11-50%.

En Uruguay se ha reportado que aproximadamente un 25-30% de los abortos bovinos por causas infecciosas son debido a leptospirosis, estimaciones que fueron realizadas por histopatología y serología de las hembras que abortaron, volviéndose así uno de los principales problemas reproductivos a nivel Nacional (Easton, 2003).

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

Zarantonelli et al.,2018, presentaron un estudio multicéntrico de 3 años que resultó en el aislamiento y caracterización detallada de 40 cepas de campo encontrando *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki (20 cepas), *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola (1 cepa), *Leptospira borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo (10 cepas) y *Leptospira Noguchii* (9 cepas). Se demostró que aproximadamente el 20% del ganado muestreado en el campo arroja Leptospiras patógenas en la orina, lo que revela una amenaza para la salud pública. En dicho estudio la técnica MAT detectó 76,6% de los focos que dieron PCR positivo y la tasa de aislamientos de *Leptospiras* spp. promedio fue de 4,5%.

5.7. Diagnostico

Para un control eficaz de una enfermedad infecciosa es fundamental una prueba de diagnóstico viable con alta sensibilidad, especificidad, y practicidad (Loureiro et al., 2013)

Debido a la amplia diversidad de signos clínicos, el diagnóstico de la Leptospirosis no resulta sencillo y depende de una gran variedad de ensayos de laboratorio (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010).

La presentación inicial de la enfermedad puede ser difícil de distinguir de otras enfermedades infecciosas, por lo que un diagnóstico rápido y preciso es

esencial para prevenir la progresión de la forma más grave de la enfermedad, especialmente en los países en desarrollo (Evangelista y Coburn, 2010).

El descubrimiento de nuevas especies de *Leptospiras* spp, resulta fundamental para el desarrollo de herramientas sólidas de detección y diagnóstico, que se necesitan desesperadamente para tratar a los huéspedes infectados de forma más rápida y adecuada (Vincent et al., 2019).

Resulta de suma importancia saber que dicho diagnóstico no solo es útil para la confirmación de la enfermedad clínica, sino también para la evaluación de la infección y / o el estado inmunológico de un rebaño a los efectos de aplicar un programa de control o erradicación, para estudios epidemiológicos, o para realizar una evaluación del estado de infectividad de un individuo en particular y así evaluar su idoneidad para el comercio internacional o para su introducción en predios considerados libres (Alder, 2015).

Las pruebas diagnósticas que se utilizan en la actualidad, tienen diferentes características, dependiendo del tipo de tejido disponible, el curso de la enfermedad y el propósito de la prueba (Jouglard, Simionatto, Seixas, Nassi y Dellagostin, 2006).

Se dividen en dos tipos, las directas, que detectan la presencia de la bacteria o su ADN en la sangre o en diversos tejidos, y las indirectas o serológicas que detectan la presencia de anticuerpos en el suero (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010, Alder, 2015).

Entre los métodos directos se encuentra la visualización directa de muestras sospechosas en microscopio de campo oscuro (Faine y Adler, 1999), el cultivo bacteriano y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Por otro lado, entre los métodos indirectos, la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es recomendada tanto por las organizaciones de salud humana como animal (Pinto, Loureiro, Penna y Lilenbaum, 2015, Loureiro et al., 2013).

5.7.1.Métodos Directos:

5.7.1.1.Microscopia de Campo Oscuro:

Las *Leptospiras* son muy delgadas y se colorean muy pobremente con los colorantes habituales como para ser observadas bajo un microscopio de campo claro convencional, por esta razón, se utiliza microscopia de campo oscuro (Guía OPS/OMS, 2008). El principio de este tipo de microscopía se basa en las reflexiones de la superficie del microorganismo magnificadas por el microscopio. En este caso, cuando el lente se enfoca en las *Leptospiras*, se logra ver a la bacteria como un objeto brillante con contraste oscuro (Loureiro et al., 2013).

Esta técnica se emplea cuando se sospecha la presencia de la enfermedad debido a cierta sintomatología presente. Se observan muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y orina del paciente al microscopio para detectar la presencia de bacterias. Las leptospiras se detectan fácil y rápidamente debido a su forma y movimiento característico, permitiendo evitar las pruebas

serológicas y haciendo posible administrar tratamientos específicos en un corto período de tiempo. Sin embargo, la técnica presenta una baja sensibilidad y especificidad, por lo que si los números de bacterias son bajos (menos de 10^4 organismos/ml), es posible que no se detecten bacterias en las muestras y se deban emplear otras técnicas como (cultivo, PCR y serología) (Picardeau, 2013; Marquez et al., 2017).

La positividad de la microscopía de campo oscuro disminuye del 100% al 90,9% a medida que aumenta la duración de la infección durante más de una semana. Otra desventaja de dicha técnica es que tanto los diagnósticos falsos positivos como falsos negativos pueden cometerse fácilmente, incluso por técnicos experimentados (Samrot et al., 2021).

La observación directa de las leptospiras requiere habilidad. Por lo tanto, este método no se emplea de forma rutinaria (Picardeau, 2013, Marquez et al., 2017).

5.7.1.2. Cultivo Bacteriano:

El diagnóstico de la enfermedad mediante la aplicación de este método presenta verdaderas dificultades ya que las Leptospiras son muy frágiles y los cultivos derivados de muestras biológicas, en particular de animales, pueden estar contaminados (Marquez et al., 2017). Además, la sensibilidad de los cultivos suele ser baja; también se requiere mucho tiempo (no permitiendo proporcionar una guía de tratamiento) y son necesarias instalaciones de laboratorio relativamente elaboradas; por lo tanto, las pruebas serológicas resultan fundamentales para confirmar los casos clínicamente sospechosos (Pinto et al, 2015).

Los cultivos se realizan en medios específicos, que contienen suero o albumina, también se emplean medios enriquecidos con suero de conejo, por lo general, los cultivos en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) compuesto de suero bovino, albumina, ácido oleico y polisorbatos, son los más utilizados para detectar leptospiras en tejidos frescos, sangre u orina, pero las leptospiras deben cultivarse antes de iniciar el tratamiento con antibióticos.

Frecuentemente se produce la contaminación de los cultivos por otros microorganismos; particularmente en casos de muestras clínicas como la orina cuando se obtiene por micción espontánea. Algunos de estos contaminantes se pueden reducir al implementar filtración a través membranas de microporos de $0,22 \mu\text{m}$ o al adicionar agentes selectivos o quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo en los medios de cultivo tradicionales. Éstos son procedimientos que se adoptan con frecuencia para prevenir o eliminar la contaminación, pero hacen que el método sea costoso, laborioso, y a menudo ineficaz (Loureiro et al., 2013, Marquez et al., 2017)

Los cultivos deben incubarse a 28–30 °C durante hasta 26 semanas y deben ser observados por microscopía de campo oscuro cada 7 a 10 días. El tiempo requerido para la detección de un cultivo positivo varía dependiendo del

serovar de leptospiras y el número de organismos viables presentes en la muestra (Alder, 2015).

Los cultivos no son útiles como una prueba de diagnóstico de rutina para pacientes individuales, pero permiten aislar y analizar cepas para estudios epidemiológicos (Marquez et al., 2017) y asesorar sobre medidas de control (Alder, 2015) también puede servir para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que mueren rápidamente después de la aparición de los síntomas y antes de que los anticuerpos puedan ser detectables. (Guía OPS/OMS, 2008)

5.7.1.3.Reacción en Cadena de la Polimerasa:

Los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han utilizado desde la década de 1990 como métodos moleculares fiables y rápidos para el diagnóstico de leptospirosis (Fang, Collins-Emerson, Cullum, Heuer, Wilson y Benschop, 2014). Pudiendo ser dicha reacción en tiempo real o en formatos clásicos a tiempo fijo (OIE, 2009).

La técnica de PCR ha sido una herramienta muy importante para la identificación de portadores. En los animales con infección crónica los niveles de anticuerpos siguen siendo bajos y para superar este problema, se necesitan métodos más sensibles para detectar el organismo en la orina o en el tracto genital (Pinto et al., 2015).

Es por esta razón, que la técnica de PCR se utiliza cada vez con más frecuencia debido a su alta sensibilidad y especificidad, a que no requiere la presencia de organismos viables y por su habilidad para dar un diagnóstico rápido cuando se cuenta con los equipos e infraestructura necesaria para su ejecución (Loureiro et al., 2013, Alder, 2015), tendiendo a sustituir a los métodos serológicos en zonas endémicas (Picardeau, 2013).

Con esta técnica, las Leptospiras se pueden detectar fácilmente a partir de muestras de orina o de sangre durante las primeras etapas de la enfermedad. Durante la leptospirosis aguda, el título de anticuerpos puede no ser lo suficientemente alto para un diagnóstico serológico preciso (Samrot et al., 2021).

La PCR presenta limitaciones, una de ellas es que un resultado negativo no descarta la posibilidad de que el animal este infectado, ya que la excreción de las bacterias por la orina es intermitente en el ganado (Hamond et al., 2014) otra limitante, es que, si bien un resultado positivo demuestra la presencia de Leptospiras patógenas, no permite la identificación directa a nivel de serovar (Alder, 2015).

Los procedimientos estándar de PCR requieren el uso posterior de electroforesis en gel de agarosa para detectar genes de leptospiras diana. Sin embargo, la PCR en tiempo real es capaz de proporcionar resultados de diagnóstico inmediatamente después de amplificar el contenido de ADN (Samrot et al., 2021) La PCR en tiempo real, no solo es más es más rápida que la PCR convencional, sino que, además, es menos sensible a las contaminaciones (Picardeau, 2013).

5.7.2.Métodos Indirectos:

Existe un gran número de técnicas serológicas que son empleadas para el diagnóstico de leptospirosis, cada una con sensibilidad y especificidad propias (Postic et al., 2000).

Las pruebas serológicas facilitan la detección e identificación de cepas de *Leptospiras*. Tales pruebas se basan en el reconocimiento de antígenos de superficie específicos y son utilizadas para análisis clínico a partir de muestras de suero extraídas de individuos sospechosos de padecer la enfermedad. (Marquez et al., 2017, Samrot et al., 2021).

En medicina veterinaria, la serología ha sido reportada como una herramienta útil para la detección de leptospirosis en rebaños, pero inadecuada para la detección de leptospiras excretadas de manera individual, que debe depender de métodos directos como el cultivo o la PCR (Hamond et al., 2014). Sin embargo, dado a que las leptospiras tienen un tiempo de multiplicación muy largo en los cultivos y los mismos toman semanas para crecer, el diagnóstico de leptospirosis depende principalmente de los resultados serológicos (Samrot et al., 2021).

5.7.2.1.Aglutinación Microscópica:

Tradicionalmente, el método de referencia para el diagnóstico de Leptospirosis es la prueba de aglutinación microscópica (MAT) (Bomfim, Barbosa-Stancioli y Koury, 2008), considerada la “prueba de oro” (Borg-Petersen, 1949; Borg-Petersen & Fagraeus, 1949; Watt et al., 1988; Postic et al., 2000) y recomendada por organizaciones tanto de salud humana como animal (Pinto et al., 2015).

El principio del MAT consiste en incubar diluciones seriadas del suero del paciente a analizar y enfrentarlo a varios serogrupos de *Leptospiras* (cultivos de *Leptospiras* vivas); los serogrupos reaccionantes se evidencian a partir de una reacción de aglutinación que se lee en un microscopio de campo oscuro (Surujballi y Mallory, 2004) para evaluar el porcentaje de aglutinación y determinar el título serológico (Loureiro et al., 2013).

La técnica detecta anticuerpos IgM como IgG (OIE, 2008).

Un suero se considera positivo, a una dilución determinada y para el antígeno analizado, si al menos el 50% de las *Leptospiras* están aglutinadas en comparación con un antígeno de control sin suero. El título umbral se establece en 1/100 y 1/400 para zonas endémicas (Picardeau, 2013).

Los antígenos seleccionados para la MAT deben incluir las cepas representativas de los serogrupos que existen en la región, además de aquellos que se sabe que persisten en otra región en la especie hospedadora objeto de estudio (Guía OPS/OMS, 2008).

Esto es así ya que la técnica puede identificar el presunto serogrupo de forma fiable, pero no es suficientemente preciso para identificar serovares debido al alto grado de reactividad cruzada que ocurre con frecuencia entre serovares dentro de un serogrupo, por lo que no puede ser considerado específico de serovariedad (Loureiro et al., 2013, Marquez et al., 2017). Una correcta

inclusión de serovares al panel de antígenos requiere de un amplio conocimiento epidemiológico (Verma, Stevenson y Adler, 2013).

Tanto la sensibilidad como la especificidad del MAT son muy elevadas (Alder y de la Peña Moctezuma, 2010).

Aunque se utiliza y recomienda ampliamente, MAT tiene importantes limitaciones.

La técnica requiere mantener un panel de serovares de *Leptospiras* vivas en medios líquidos (EMJH), lo que requiere repetidas revisiones semanales y subcultivos de un gran número de cepas, presentando peligros potenciales para los trabajadores de laboratorio, como mínimo, el panel debe incluir todos los serovares que circulan localmente y un panel incompleto puede ser responsable de resultados falsos negativos (Loureiro et al., 2013), necesita de la presencia en laboratorio de gente altamente capacitada (Picardeu, 2013), se considera una técnica subjetiva, que depende del ojo del operador a la hora de leer los resultados bajo microscopia de campo oscuro (Bomfim et al., 2008), no es capaz de diferenciar entre infecciones actuales, recientes o pasadas, o incluso diferenciar los anticuerpos vacunales de los producidos por infecciones naturales (Loureiro et al., 2013).

La sensibilidad de la prueba varía dependiendo de la etapa de la infección en la que el animal se encuentre, ya sea aguda o crónica (Alder, 2015).

No sería útil como diagnóstico durante las primeras etapas de la enfermedad, debido a que la técnica se basa en la detección de anticuerpos contra antígenos de leptospiras, que no se vuelven detectables hasta 1 semana después de la aparición de los síntomas (Cerqueira y Picardeau, 2009, Samrot et al., 2021).

El muestreo antes de la seroconversión durante la etapa aguda de la enfermedad puede dar resultados falsos negativos en la detección de anticuerpos (Picardeau, 2013).

Para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, es importante remitir al laboratorio una segunda muestra de suero de aproximadamente 7 a 10 días después. Si se evidencia un aumento del título o la seroconversión se tratará de un animal en una etapa temprana de la infección (Faine y Adler, 1999, Cerqueira y Picardeau., 2009).

El MAT tiene severas limitaciones en el diagnóstico de infección crónica en animales individuales, tanto en el diagnóstico de aborto como en la identificación de enfermedades renales o portadores genitales donde los títulos están cayendo o están estáticos. Los animales infectados pueden tener títulos por debajo del título mínimo significativo ampliamente aceptado de 1/100 (Adler, 2015)

En áreas en las que la leptospirosis no es endémica, un título bajo ($> 1/100$) en el MAT con uno o varios antígenos puede indicar que el paciente tiene leptospirosis. Por el contrario, en áreas en las que la leptospirosis es endémica, se debe obtener un título alto ($> 400-800$) en el MAT para la sospecha de leptospirosis (Cerqueira y Picardeau, 2009).

5.7.2.2. Inmunofluorescencia Directa:

El principio de la Inmunofluorescencia es el reconocimiento de una proteína de superficie de la leptospira, por anticuerpos específicos. Anticuerpos secundarios acoplados a una tinción fluorescente luego se unen a los anticuerpos específicos del huésped. Cuando las muestras son observadas bajo un microscopio de fluorescencia, los perfiles bacterianos son detectables. Éste ensayo facilita la identificación rápida de leptospiras (Marquez et al, 2017).

La prueba se puede realizar para la detección de leptospiras patógenas, así como para la confirmación visual de la morfología de las leptospiras intactas excretadas activamente en la orina. Sin embargo, no proporciona identificación de especies o serovariedades (Nally, Ahmed, Putz, Palmquist y Goris., 2020).

La técnica de Inmuno-Fluorescencia Directa (IFD) en orina de bovinos se ha empleado para el diagnóstico de *Leptospita hardjo* reportándose una sensibilidad entre 89% y 93% (Wagenaar et al., 2000).

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivos Generales:

Validación experimental y a campo de dos pruebas de diagnóstico directas para la detección de animales infectados con *Leptospiras* patógenas.

6.2. Objetivos Específicos:

- Determinación de la sensibilidad analítica del cultivo bacteriológico a partir de muestras de orina experimentalmente inoculadas con *Leptospira spp.*
- Validación del método de Inmunofluorescencia Directa (IFD) en muestras de orina experimentalmente inoculadas con *Leptospiras spp.*
- Evaluación del MAT (suero) e IFD (orina) para el diagnóstico de Leptospirosis bovina a campo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1. Ensayo experimental

Se tomaron muestras de orina y de sangre de 10 bovinos negativos a MAT pertenecientes a DILAVE.

Las muestras de sangre se procesaron para realizar el análisis serológico a partir de la prueba de MAT a cada animal en paralelo al muestreo de orina.

Para el análisis serológico se extrajeron 5cc. de sangre por veno-punción coccígea. La sangría se realizó con agujas descartables de 18 G x 1 y ½ y jeringas descartables de 10 ml. Posteriormente en el laboratorio DILAVE, Departamento de Bacteriología y luego de producido el proceso de formación del coágulo, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 2000 r.p.m., para separar el suero y así poder realizar la MAT con el fin de determinar la seronegatividad de dichos animales.

Para la extracción de orina los animales fueron inmovilizados en el cepo, se les administró furosemida al 5% dosis 0,02 ml/kg. vía intramuscular y se limpió el área genitourinaria con un algodón embebido en alcohol 70°.

Se esperó a que el animal comenzara la micción haciendo masajes estimulatorios perivulvares, por último, se colectó aproximadamente 40cc. de la segunda fracción de la orina en un frasco estéril (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Dichos procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de DILAVE.

En el laboratorio, cada muestra de orina fue sembrada en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con y sin 5-fluorouracilo (medio selectivo y no selectivo respectivamente) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Cada tubo se inoculó con un mix de leptospiras extraídas del cepario de referencia del Servicio de Leptospirosis de DILAVE (Canicola, Grippotyphosa, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona)(Tabla I).

Tabla 1. Serovares del cepario de referencia

Especie	Serogrupo	Serovar
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. borpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola

Para formular el mix se realizó un conteo de Leptospiras en cámara de Petroff-Hausser en microscopio de campo oscuro. Se partió de una concentración de inóculo de Leptospiras de 1×10^7 leptospiras/ml del mix. A partir de ésta concentración bacteriana se realizaron 7 diluciones seriadas en base 10.

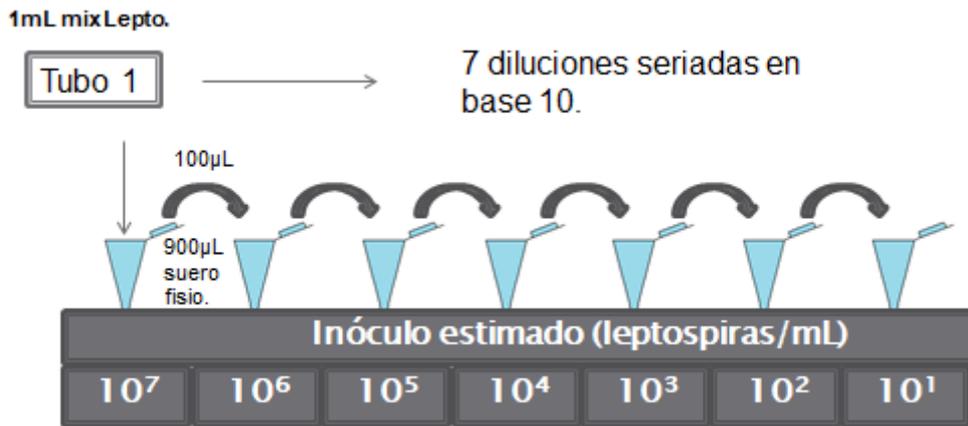


Figura 4 Proceso de preparación de las diluciones seriadas en base 10 del mix de Leptospiras.

Una vez que se determinó el número de leptospiras por mililitro de dilución se inocularon las orinas previamente extraídas. Se prepararon tubos de 9 ml de orina y se les inoculo 1 ml de la dilución previamente preparada. Se inoculó un tubo de cada dilución en los dos medios de cultivo (EMJH y EMJH+5FU), así mismo se sembraron 2 tubos por dilución cada uno con una dilución de 1/50 denominados tubos A y B respectivamente, en cada medio de cultivo.

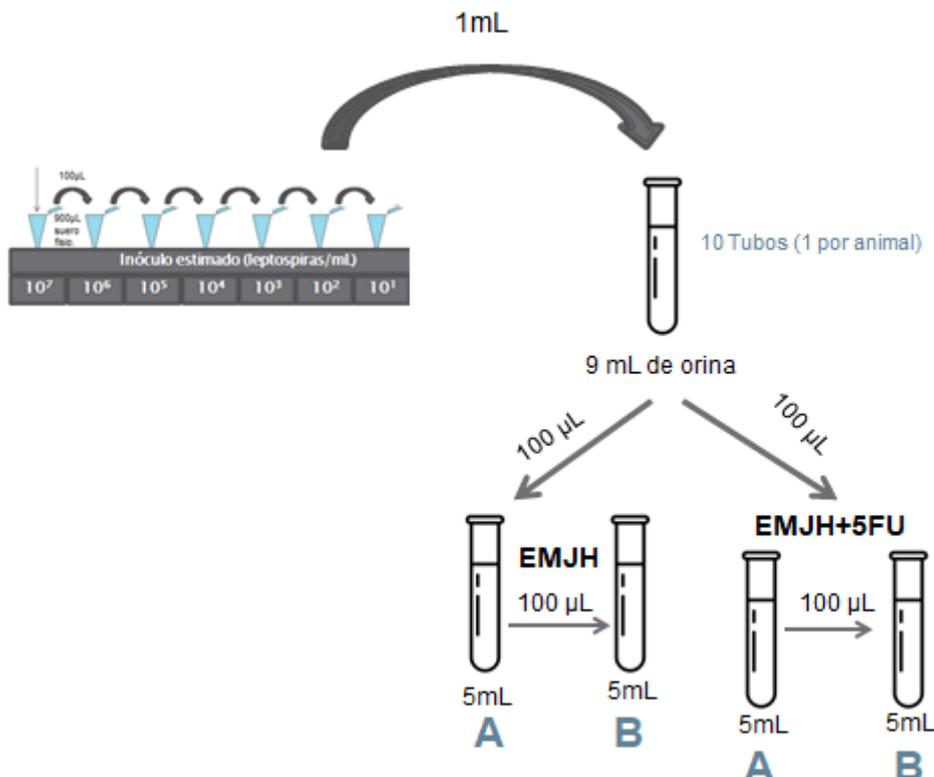


Figura 5 Proceso de preparación de los cultivos.

Orinas inoculadas con las diluciones del mix previamente preparado y sembradas en medios de cultivo selectivo (EMJH) y no selectivo (EMJH+5FU), cada uno con 2 diluciones (tubos A y B).

Los tubos se incubaron en estufa de cultivo a 29°C y se observaron semanalmente bajo microscopio de campo oscuro con el fin de detectar el crecimiento de leptospiras en cada dilución y el grado de contaminación del cultivo. Ambas variables fueron clasificadas en una escala del 1 al 3 (mediante estimación visual), donde el número 1 correspondía a los tubos con menor crecimiento de leptospiras y menor grado de contaminación, el 2 eran tubos intermedios y 3 eran tubos con evidente crecimiento de leptospiras pero principalmente contenían un elevado grado de contaminación con organismos que no correspondían al género *Leptospira* como cocos y bacilos. Llegado a 3 de crecimiento y contaminación los tubos eran descartados. También se realizaron subcultivos de los tubos sospechosos, para lo cual se procedió a realizar filtración con filtros de 0,22 micras y una re-siembra en un tubo con medio EMJH sin inhibidores; con igual procedimiento de visualización semanal y eliminación al llegar al nivel 3 de crecimiento y contaminación.

Las muestras de orina también fueron utilizadas para realizar improntas para IFD; la misma se realizó en todas las diluciones. Se colocaron las orinas inoculadas en un portaobjetos especial junto con un control positivo (mix de leptospiras diluido a la mitad) y uno negativo (suero fisiológico estéril). Se secaron en estufa durante 30 minutos, luego se fijaron con acetona durante 10 minutos, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS pH 7,4, se colocó el conjugado de conejo multivalente anti-leptospira correspondiente a anticuerpo unido con isotiocianato de fluoresceína (USDA, EE.UU) (Wagenaar, J., Zuerner, R.L., Alt, D., y Bolin, C.A. (2000). Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 61(3),316-320.

Se incubó en estufa durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, se repitió el procedimiento de lavado y los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente evitando la luz, por último, se montaron con glicerina, se colocó el cubreobjetos y se observaron en un microscopio para Inmunofluorescencia con objetivo 60X.

7.2. A campo

Una vez que se validó el protocolo de IFD con las muestras inoculadas experimentalmente el mismo también fue validado a campo y para ello se tomaron muestras de sangre y orina de 96 animales provenientes de 8 rodeos positivos, con antecedentes de aborto y/o enfermedad aguda en terneros, con serología positiva a MAT. Dichos focos fueron detectados en DILAVE Central (Montevideo) en el Servicio de Leptospirosis a partir de las muestras de sangre que enviaron los veterinarios particulares. En cada establecimiento se extrajeron muestras de orina para realizar IFD y sangre para la técnica de MAT de 12 animales. Las muestras de orina fueron extraídas de la misma forma que en el diseño experimental.

7.3. Análisis estadístico

La sensibilidad analítica de la técnica de IFD y de los cultivos bacteriológicos (objetivos 1 y 2) se analizó a partir de la regresión "probit", por otro lado, para determinar la capacidad diagnóstica relativa de la técnica de IFD con respecto a la técnica de referencia en Uruguay (MAT) (objetivo 3), se calculó la concordancia entre ambas pruebas mediante el índice Kappa de Cohen. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete STATA versión 15.

8. RESULTADOS:

8.1. Sensibilidad Analítica:

Para determinar la sensibilidad analítica del cultivo bacteriológico a partir de muestras de orina experimentalmente inoculadas y la validación del método de IFD los resultados fueron analizados por la regresión "probit" donde la variable dependiente puede tomar dos valores, respuesta de carácter binario (negativo/positivo) resultado de la prueba y como variable explicativa independiente se basó en el logaritmo de base 10 de la dilución "log_dil".

Este modelo permitió calcular la probabilidad de obtener un resultado positivo basado en la dilución utilizada permitiendo determinar la concentración de inóculo de bacterias que es detectada en el 50% de las veces por las 2 pruebas evaluadas, así como otros percentiles de interés como el P_{75} que representa la concentración detectada con una probabilidad=0.75

El modelo probit utiliza la función de distribución acumulada de la normal estandarizada.

Tabla 2. Resultados de la Sensibilidad Analítica para el medio de cultivo no selectivo (EMJH), para los Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)

Medio EMJH Tubo A			Medio EMJH Tubo B		
log_dil		mean (resul~01)	log_dil		mean (resul~01)
1		0.8031	1		0.9831
2		0.6879	2		0.9408
3		0.5507	3		0.8413
4		0.4070	4		0.6694
5		0.2750	5		0.4509
6		0.1684	6		0.2466
7		0.0929	7		0.1062

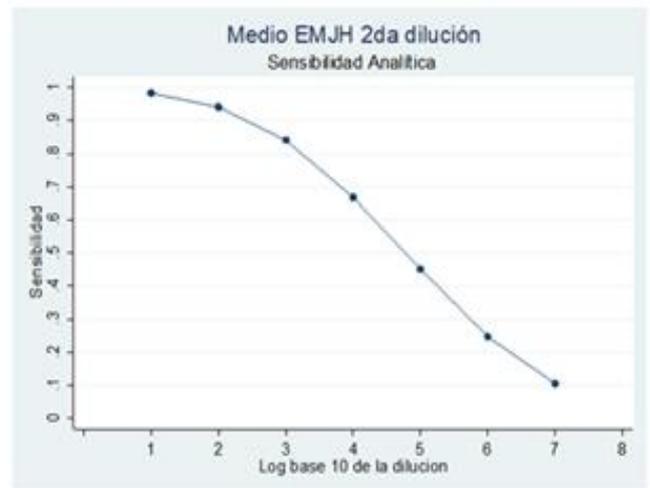
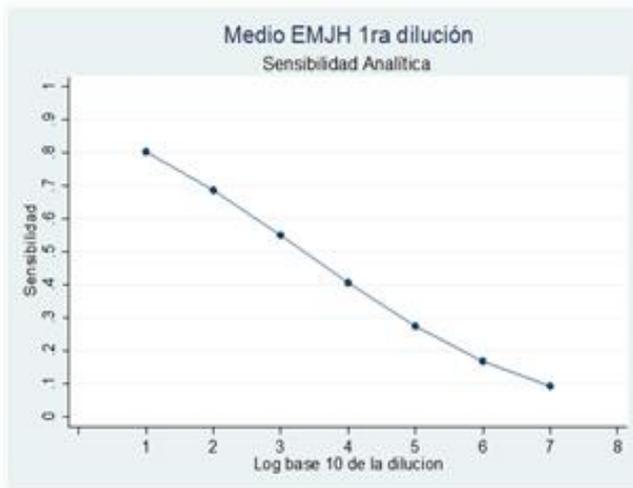


Figura 6 Graficas de Sensibilidad Analítica para Medio de cultivo No Selectivo, Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)

Tabla 3. Resultado de la Sensibilidad Analítica del medio de cultivo Selectivo (EMJH+5FU) para los tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)

Medio EMJH+5FU Tubo A		Medio EMJH+5FU Tubo B	
log_dil	mean (resul~01)	log_dil	mean (resul~01)
1	0.8762	1	0.9897
2	0.8079	2	0.9679
3	0.7205	3	0.9173
4	0.6173	4	0.8223
5	0.5050	5	0.6777
6	0.3923	6	0.4993
7	0.2880	7	0.3211

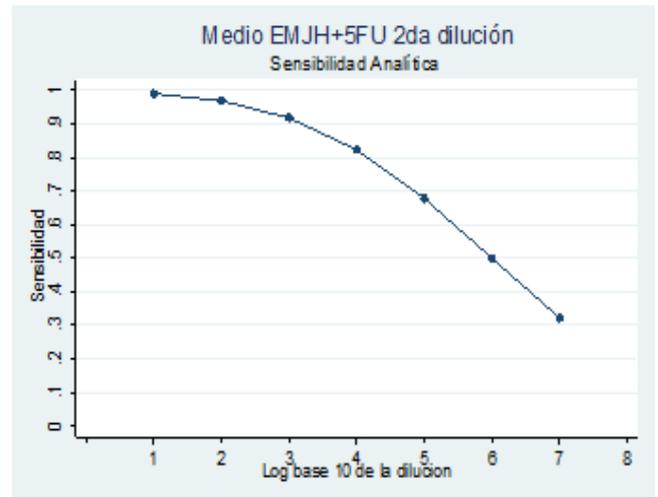
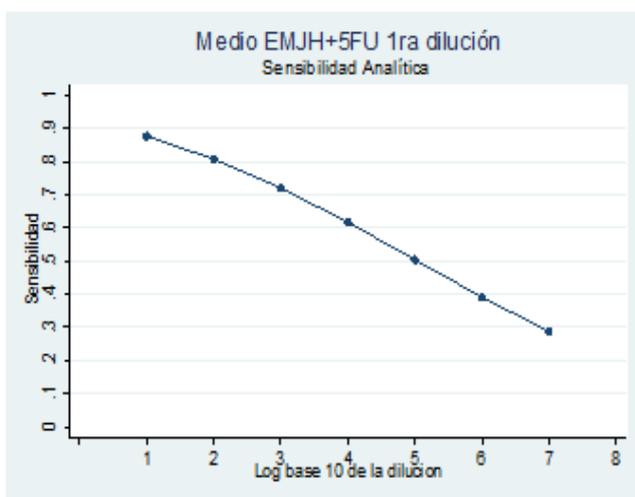


Figura 7 Grafica de la Sensibilidad Analítica para el medio de cultivo Selectivo, para los Tubos A y B (primera y segunda dilución respectivamente)

Se observó que las leptospiras inoculadas experimentalmente crecieron en ambos medios de cultivo (selectivo y no selectivo), sin embargo, la sensibilidad analítica fue mayor con el medio de cultivo selectivo (EMJH +5FU) Tabla 3.

Dentro del medio selectivo el tubo B (más diluido) presentó mejor sensibilidad analítica que el tubo A. La sensibilidad analítica en la dilución 3 (1×10^4 leptospiras/ml) fue de 0,72 para el tubo A y de 0.92 para el tubo B.

Tabla 4. Resultados de la Sensibilidad Analítica de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD)

IFD	
log_dil	mean (resul~01)
1	0.9994
2	0.9715
3	0.7093
4	0.2116
5	0.0156
6	0.0002
7	0.0000

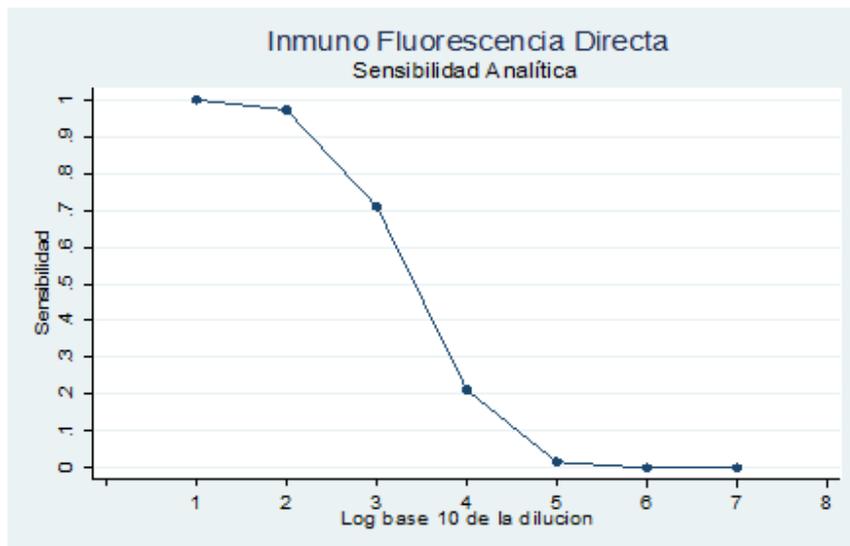


Figura 8 Gráfica de la Sensibilidad Analítica de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD)

La sensibilidad analítica para la técnica de IFD fue de 0,70 (dilución 3).

Para ser detectados por IFD los animales deben eliminar concentraciones altas de leptospira en la orina de al menos 1×10^4 leptospiras/ml.

Índice Kappa de Cohen:

El Índice Kappa de Cohen es una medida estadística que puede ser utilizada para evaluar la concordancia entre dos pruebas diagnósticas que arrojan resultados categóricos (dos o más categorías), dicho índice representa la proporción de acuerdos que existen por encima de lo esperado por el azar.

En este estudio se determinó el grado de concordancia entre la técnica de MAT respecto a la técnica de IFD para las 96 muestras analizadas por ambas pruebas (Tabla V). Según la clasificación de Galton (1892) especificada en la tabla VII, se observó que el acuerdo entre ambas pruebas diagnósticas fue "pobre" (Kappa = 0.169).

Tabla 5. Resultados del desempeño de la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) usando como referencia la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD).

MAT	IFD		
	Negativo	Positivo	Total
Negativo	53	5	58
%	55.21	5.21	60.42
Positivo	29	9	38
%	30.21	9.38	39.58
Total	82	14	96
%	85.42	14.58	100

Tabla 6. valor del Índice Kappa de Cohen.

Concordancia entre MAT e IFD					
Acuerdo %	Acuerdo esperado %	Kappa	Error estándar	Z	Prob>Z
64.58	57.38	0.169	0.0827	2.05	0.0204

Tabla 7. Clasificación de Galton para interpretar los valores de Kappa.

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

9. DISCUSIÓN

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con distintos trabajos publicados en los que se emplearon las mismas técnicas diagnósticas, pero con variaciones tanto en las especies de estudio como en los serovares seleccionados, el diseño de los ensayos y el análisis de los resultados.

Los resultados del objetivo 1, proporcionan información sobre factores seleccionados (tipo de medios, agentes selectivos) que influyen en el éxito del cultivo y aislamiento de *Leptospiras* de orina de bovinos inoculadas experimentalmente.

La bibliografía describe diferentes medios para el cultivo y aislamiento de *Leptospira*, uno de los más comúnmente utilizados es el medio (EMJH) tal como lo mencionamos anteriormente. Varios contaminantes crecen en dicho medio, lo que dificulta la obtención de aislamientos puros de la bacteria. El medio EMJH+5FU contiene un agente selectivo para suprimir el crecimiento de dichos contaminantes (Loureiro et al., 2013, Marquez et al., 2017).

En nuestro ensayo, se observó el crecimiento de las *Leptospiras* inoculadas en ambos medios de cultivo, sin embargo, el uso del medio EMJH+5FU fue más exitoso en comparación con el medio EMJH sin agente selectivo. Éstos resultados son comparables con el estudio llevado a cabo por Steinparzer et al., 2021 que plantea como objetivo determinar la influencia de los agentes selectivos en el éxito del cultivo y aislamiento de *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* a partir de orina porcina inoculada experimentalmente, en los que también se emplearon dos medios, EMJH y EMJH+STAFF, que incluía los agentes selectivos sulfametoxazol, trimetoprima, anfotericina, fosfomicina y 5-fluorouracilo, al igual que en nuestro ensayo los cultivos se diferenciaron en cuatro categorías con respecto a la detección microscópica semanal de *Leptospira* y contaminantes. Steinparzer y colaboradores observaron que en comparación con los cultivos EMJH, el número de cultivos EMJH-STAFF con crecimiento de leptospiras fue mayor cada semana y en todos ellos. Por tanto, recomiendan el medio EMJH-STAFF para el aislamiento primario de *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* de orina de cerdos.

Johnson y Rogers 1964 también estudiaron el uso del 5FU como agente selectivo para el crecimiento de leptospiras tanto patógenas como saprofitas (*Leptospira interrogans* serovares Pomona, Canicola y Australis, como patógenas, y *Leptospira biflexa*, como saprofita), demostrando que las leptospiras crecen normalmente en la presencia de 5FU ya que ninguna de ellas fue inhibida por el agregado de dicho agente., además demostraron que los cultivos de leptospiras contaminados se purificaron mediante el pasaje a través del medio con 5FU, hecho que pudimos comprobar en este estudio. Así mismo mediante el uso de este medio lograron aislar con éxito *Leptospira interrogans* serovar Canicola de orina contaminada de perros infectados experimentalmente.

Las leptospiras son organismos de crecimiento lento que tienen un tiempo de generación de aproximadamente 24 horas a 30°C. La combinación de éste lento crecimiento y la necesidad de un medio rico a pH neutro predispone a los cultivos de leptospiras a problemas de contaminación, por lo que según los autores y a favor de lo que mencionamos anteriormente, resulta fundamental para el éxito en los cultivos el empleo de agentes selectivos, principalmente el 5FU (Johnson y Roger., 1964).

Para los objetivos 2 y 3 se compararon los resultados con el estudio realizado por Rajeev et al., 2010 sobre la comparación de las técnicas de IFD y MAT para el diagnóstico de Leptospiras en vacas gestantes y no gestantes. Los autores enfrentaron las muestras a los mismos serovares con el agregado de dos más, (Autumnalis y Bratislava) y observaron que 7 de cada 10 rebaños tenían al menos una vaca con leptospiuria, en cambio, todos los rebaños tenían al menos una vaca con títulos de MAT ≥ 100 para uno o más serovares, al igual que nosotros dejaron en evidencia que la detección de anticuerpos en suero mediante la técnica de MAT resulta más sensible que la detección de anticuerpos en orina mediante la técnica de IFD

Sin embargo, otros autores han reportado mejores resultados con respecto a la técnica de IFD para el diagnóstico de Leptospira al emplearla en una matriz diferente a la que utilizamos en nuestro estudio. Tal es el caso de Cantón et al., (2015), que en su análisis retrospectivo de patología y resultados de IFD de improntas de tejidos de fetos bovinos abortados por Leptospirosis demostraron que la IFD resulta efectiva en el diagnóstico de abortos por dicha bacteria siendo el hígado y el riñón los tejidos más adecuados para la realización de improntas. De un total de 39 fetos procesados todos tuvieron al menos 1 impronta positiva a la IFD. Sin embargo, a diferencia de la orina estas muestras son obtenidas postmortem.

10. CONCLUSIONES

Se concluye que, en el momento del aislamiento, se recomienda el medio selectivo ya que tiene mayor sensibilidad. Un factor que pudo estar afectando la detección de leptospiras en los cultivos fue el grado de contaminación, por esta razón el uso del medio selectivo y la dilución de la muestra resultó más favorable. Las leptospiras son difíciles de cultivar y los cultivos deben ser incubados durante largos períodos de tiempo, por tanto, los medios selectivos con inhibidores disminuirían la contaminación mejorando el crecimiento de dichas bacterias. Por otro lado, la técnica de IFD presentó una baja sensibilidad teniendo como desventaja la presencia de animales falsos negativos que puedan estar excretando bajas concentraciones del microorganismo. Esta técnica podría usarse como complemento de la técnica de MAT y realizando un muestreo a nivel de las poblaciones de animales a nivel de predio y no así, como diagnóstico individual.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alder, B., S., Faine, W.L. Christopher, R.J., y Chappel, I, (1986). Development of an improved selective medium for isolation of Leptospira from clinical material. *Veterinary Microbiology*, 12, 377-381.
- Adler, B. (2015). History of leptospirosis and leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 1-9.
- Adler, B., y de la Pena Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296.
- Ahmed, A., Anthony, R. M., y Hartskeerl, R. A. (2010). A simple and rapid molecular method for Leptospira species identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 955-962.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., ... Peru—United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757-771.
- Borg-Petersen, C. (1949). Experience of Leptospirosis in Denmark. *Discussion on Leptospirosis. Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 42, 714-718.
- Borg-Petersen, C. y Fagraeus, A. (1949). The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 26(4), 555-567.
- Bomfim, M. R. Q., Barbosa-Stancioli, E. F., y Koury, M. C. (2008). Detection of pathogenic leptospira in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *The Veterinary Journal*, 178(2), 251-256.
- Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., y Weyant, R. S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(Pt 2), 839-858.
- Cantón, G., García, J., Lischinsky, L., Fiorentino, A., Moore, P., Odeón, A., ... Morrell, E. L. (2015 agosto). Hallazgos patológicos y diagnóstico en fetos bovinos abortados por Leptospira spp. según casuística del INTA EEA Balcarce, 1994-2014. *Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica*. Mar del Plata, Buenos Aires.
- Carleton, O., Charon, N.W., Allender, P., y O'brien, S. (1979). Helix handedness of Leptospira interrogans as determined by scanning electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 137(3), 1413-1416.
- Cerqueira, G. M. y Picardeau, M. (2009). A century of Leptospira strain typing.

Infection, Genetics and Evolution, 9(5), 760-768.

Dufour, Á., Moutou, F., Hattenberger, A. M., y Rodhain, F. (2008). Global change: impact, management, risk approach and health measures--the case of Europe. *Revue Scientifique et Technique*, 27(2), 529-550.

Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., ... Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1013.

Easton, C., Paullier, C., y Bañales, P. (2003). Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE "Miguel C. Rubino", Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 38, 25-30.

Ellis, W. A. (1984). Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1-4), 411-421.

Ellis, W.A. (2015) Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 99-125.

Ellis, W. A., O'brien, J. J., Neill, S. D., y Bryson, D. G. (1986). Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Veterinary Microbiology*, 11(3), 293-299.

Evangelista, K.V., y Coburn, J. (2010). Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, 5(9), 1413- 1425.

Faine, S. y Adler, B. (1999). *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne: MediSci.

Fang, F., Collins-Emerson, J. M., Cullum, A., Heuer, C., Wilson, P. R., y Benschop, J. (2014). Shedding and seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep and cattle at a New Zealand abattoir. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), 258-268.

Gil, A. (2003). *Evaluacion de un sistema de monitoreo longitudinal de salud en la producción lechera* (Proyecto INIA 2003).

Goldstein, S.F., y Charon, N.W. (1988). Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 9(2), 101-110.

Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A. P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., y Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Veterinary Research Communications*, 38(1), 81-85.

Johnson, R. C., y Rogers, P. (1964). 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of leptospirae. *Journal of Bacteriology*, 87(2), 422-426.

Jouglard, S. D. D., Simionatto, S., Seixas, F. K., Nassi, F. L., y Dellagostin, O. A. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic

- leptospire. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(8), 747-752.
- Ko, A. I., Goarant, C., y Picardeau, M. (2009). Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 736-747.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 296–326.
- Loureiro, A. P., Martins, G., Thomé, S., y Lilenbaum, W. (2013). Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 20(3), 119-126.
- Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V., y Kodjo, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. *International Microbiology*, 20(4), 184-193.
- Nally, J. E., Ahmed, A. A., Putz, E. J., Palmquist, D. E., & Goris, M. G. (2020). Comparison of real-time PCR, bacteriologic culture and fluorescent antibody test for the detection of *Leptospira borgpetersenii* in Urine of naturally infected cattle. *Veterinary Sciences*, 7(2), 66.
- Nerving, R. M., y Garrett, L.A. (1979). Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *American Journal of Veterinary Research*, 40(8), 1197-1200.
- OIE (2009). *Un mundo, una salud*. Paris: International Office of Epizootics.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1-9.
- Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B., y Lilenbaum, W. (2015). Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trópica*, 149, 163-167.
- PLANISA (s.f). Recuperado de <http://acadevet.org/wp-content/uploads/PLANISA-Completo.pdf>
- Postic, D., P., Merien, F., Perolat, P., y Baranton, G. (2000). *Diagnostic biologique Leptospirose-Borreliose de Lyme*. París: Institut Pasteur.
- Radostits, O.M., y Blood, D.C. (2002). *Medicina Veterinaria Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, y equino* (9ª ed., Vol. 1, pp. 1151-1168). Madrid: Mac Gaw- Hill.
- Rajeev, S., Berghaus, R. D., Overton, M. W., Pence, M. E., y Baldwin, C. A. (2010). Comparison of fluorescent antibody and microscopic agglutination testing for *Leptospira* in pregnant and nonpregnant cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(1), 51-54.
- Samrot, A. V., Sean, T. C., Bhavya, K. S., Sahithya, C. S., Chan-Drasekaran, S.,

- Palanisamy, R., ... Mok, P. L. (2021). Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—A review. *Pathogens*, 10(2), 145.
- Steinparzer, R., Mair, T., Unterweger, C., Steinrigl, A., y Schmoll, F. (2021). Influence of Selective Agents (EMJH-STAFF), Sample Filtration and pH on *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Cultivation and Isolation from Swine Urine. *Veterinary Sciences*, 8(6), 90.
- Suanes, A., y Gil, A. (2013). Leptospirosis Bovina: enfermedad, epidemiología y diagnóstico serológico. En MEC, *Leptospirosis* (pp. 18-26). Montevideo: Academia Nacional de Veterinaria.
- Surujballi, O., y Mallory, M. (2004). An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68(1),1-6.
- Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., y Kudo, S. (2013). Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology and Immunology*, 57(3), 236-239.
- Verma, A., Stevenson, B., y Adler, B. (2013) Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1-2), 61-66.
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., ... Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270.
- Watt, G., Alquiza, L. M., Padre, L. P., Tuazon, M. L., y Laughlin, L. W. (1988). The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(4), 840-842.
- Wagenaar, J., Zuerner, R.L., Alt, D., y Bolin, C.A. (2000). Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 61(3),316-320.
- WHO (1999). Leptospirosis worldwide, 1999. *Weekly Epidemiological Record*, 74(29), 237-242.
- Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., y Easton, C. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9), e0006694.