



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**EFFECTOS DE LA INFECCIÓN NATURAL POR *LEPTOSPIRA* SPP.
SOBRE LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE VAQUILLONAS
HOLSTEIN**

VICTORIA URIOSTE ARRICAR

TESIS DE MAESTRÍA EN FACULTAD DE VETERINARIA

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

EFFECTOS DE LA INFECCIÓN NATURAL POR *LEPTOSPIRA* SPP.

SOBRE LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE VAQUILLONAS

HOLSTEIN

VICTORIA URIOSTE ARRICAR

Gustavo Gastal

Director de Tesis

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Jorge Gil; DVM, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la Republica - Uruguay

Caroline da Silva Silveira; DVM, MS, PhD
Plataforma en Salud Animal
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – INIA- Uruguay

Sergio Farias Vargas Júnior; DVM, MS, PhD
Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Rio Grande do Sul - Brasil

2021

ACTA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: plataforma zoom, jueves 23/12 de 2021

TRIBUNAL: Jorge Gil, Caroline Da Silva, Sergio Vargas

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4784146-5	URIOSTE ARRICAR, VICTORIA	S S S	12

FUNDAMENTACIÓN

El trabajo de tesis comprende un experimento que implica un período de tiempo importante al que la estudiante de maestría debió dedicarse. Presenta un buen enfoque en un tema de gran interés para los sistemas lecheros, y considera un abordaje original en el estudio de cambios morfológicos relacionados al estado de portador/infectado de los animales involucrados. El material escrito cuenta con detalles menores que pueden ser mejorados, pero que no afectan a la calidad general de la tesis. La bibliografía utilizada es muy actual y adecuada para fundamentar la importancia del tema. La estudiante demuestra pleno conocimiento del trabajo y una gran dedicación a lo largo de la tesis. La hipótesis y los objetivos fueron claros y bien considerados en la discusión. En coherencia con los objetivos, las conclusiones son también adecuadas. Se destaca en la defensa oral por su precisión en las respuestas, demostrando una adecuada formación conceptual, respondiendo con solvencia y seguridad las preguntas formuladas por el Tribunal.

TRIBUNAL

Caroline Da Silva

Sergio Vargas

Jorge Gil

FIRMA

Caroline da Silva Silveira

Sergio Vargas

Jorge Gil

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

AGRADECIMIENTOS

Al INIA por su apoyo como institución, poniendo a disposición las instalaciones, el equipamiento y por su financiamiento para poder realizar este trabajo.

A mi tutor, Gustavo, gracias por el apoyo y la enseñanza constante, por tu paciencia y sobre todo gracias por tu confianza.

Al Institut Pasteur de Montevideo, especialmente a Leticia y Alejandro, por el procesamiento de las muestras y el apoyo constante aun en momentos difíciles.

A la gente de la PSA y lechería por estar siempre presentes con su gran ayuda y buena onda.

A mi familia, mis padres y hermanas, que siempre creyeron en mi con un apoyo incondicional, no me dan las palabras para agradecerles.

A mi amigo Berni, que desde el día uno fue un gran compañero y un “cable a tierra” con su paciencia y ayuda constante.

A Manolo, mi compañero de vida, en este proceso también necesitamos pilares que nos guíen para no salirnos del camino y poder seguir adelante sin importar la causa. ¡GRACIAS!

A mis amigos y colegas que siempre estuvieron ahí, para darme un empujón y un buen consejo.

¡Este trabajo es en equipo! Sin ustedes no hubiera sido posible

A todos, ¡MUCHAS GRACIAS!

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
SUMMARY	vi
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	vii
1. INTRODUCCION	13
2. REVISION DE LITERATURA	15
2.1. <i>Generalidades de la leptospirosis</i>	15
2.2. <i>Epidemiologia</i>	15
2.3. <i>Características de la bacteria</i>	15
2.4. <i>Patogénesis</i>	16
2.4.1. <i>Relevancia en la gestión de riesgos de calidad de manejo en predios lecheros</i>	17
2.5. <i>Métodos de diagnóstico</i>	18
2.5.1. <i>MAT</i>	18
2.5.2. <i>PCR y qPCR</i>	19
2.5.3. <i>Otras técnicas</i>	19
2.6. <i>Métodos de control/prevenición</i>	20
2.6.1. <i>Vacunación</i>	20
2.7. <i>Efectos de la infección por Leptospira spp sobre la reproducción bovina</i>	21
2.7.1. <i>Aspectos en la fisiología uterina y ovárica</i>	22
2.7.2. <i>Aspectos sobre la fertilidad</i>	22
2.7.3. <i>Aspectos sobre la gestación</i>	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. HIPOTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1. <i>Objetivo general</i>	27
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
6. MATERIALES Y METODOS	28
6.1. <i>Diseño experimental y manejo de los animales</i>	28
6.1.1. <i>Colectas de sangre y orina</i>	29

6.1.2.	<i>Detección e identificación de Leptospira spp.</i>	29
6.1.2.1.	<i>Detección de ADN de Leptospiras patógenas por qPCR</i>	30
6.1.2.2.	<i>MAT</i>	30
6.1.2.3.	<i>Aislamientos</i>	30
6.2.	<i>Evaluación de características fisiológicas reproductivas</i>	30
6.2.1.	<i>Edad al primer celo y expresión de celo diariamente</i>	30
6.2.2.	<i>Evaluación de ciclicidad por ecografía y protocolo reproductivo</i>	31
6.2.3.	<i>Ecografías</i>	31
6.2.3.1.	<i>Ecografías pre-servicio</i>	31
6.2.3.2.	<i>Ecografías post-servicio</i>	31
6.2.4.	<i>Análisis hormonal de P4</i>	32
6.2.5.	<i>Índices reproductivos</i>	32
6.3.	<i>Análisis estadístico</i>	33
7.	RESULTADOS	34
7.1.	<i>Detección de Leptospira spp.</i>	34
7.2.	<i>Pubertad: detección del primer-estro y frecuencia de celos</i>	36
7.3.	<i>Características de la población folicular y diámetro del folículo preovulatorio al momento de la primera inseminación</i>	37
7.4.	<i>Servicios reproductivos y pérdidas gestacionales</i>	38
7.5.	<i>Espesor del endometrio y diámetro de la arteria uterina</i>	40
7.6.	<i>Desarrollo de los placentomas y cuerpo lúteo</i>	41
7.7.	<i>Concentración de progesterona</i>	44
8.	DISCUSION	46
8.1.	<i>Principales hallazgos de este estudio</i>	46
8.2.	<i>Periodo de desarrollo inicial de la recria: 3-14 meses de edad</i>	46
8.3.	<i>Período de servicios reproductivos (14-16 meses de edad)</i>	47
8.3.1.	<i>Características de la población folicular y diámetro del folículo preovulatorio al momento de la primera inseminación</i>	47
8.3.2.	<i>Pérdidas reproductivas tempranas</i>	48
8.4.	<i>Período gestacional (15-24 meses edad)</i>	49

8.4.1.	<i>Diámetro del endometrio y de la arteria uterina</i>	49
8.4.2.	<i>Desarrollo de los placentomas y cuerpo lúteo</i>	50
8.4.3.	<i>Concentración de progesterona</i>	51
8.5.	<i>Consideraciones finales</i>	51
9.	CONCLUSIONES	52
10.	REFERENCIAS	53

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida a nivel mundial que causa impacto negativo en la reproducción, pudiendo provocar abortos e infertilidad a través de muertes embrionarias tempranas y trastornos en la fisiología del ciclo estral. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fisiología reproductiva y los parámetros de performance reproductiva en vaquillonas naturalmente infectadas por *Leptospira* spp. Se realizó un estudio prospectivo con 60 terneras Holstein negativas a *Leptospira* spp. pertenecientes a un predio positivo. A partir de los 3 meses hasta los 24 meses de edad, de forma mensual, se extrajo orina y sangre de cada animal para la evaluación de una posible nueva infección. Por otro lado, se evaluaron distintos parámetros reproductivos como ser la edad de la pubertad, repetición de celos y estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo) durante el manejo reproductivo. En los días 30, 60, 120, 180 y 240 post inseminación se realizaron ecografías modo B y Doppler para evaluar la presencia fetal, el diámetro endometrial, diámetro e irrigación sanguínea del cuerpo lúteo, diámetro irrigación sanguínea de los placentomas y diámetro de la arteria uterina. A su vez, se determinó las concentraciones de progesterona a lo largo de la gestación. Los índices reproductivos como la tasa de concepción, la repetición de servicios, la tasa de preñez final y las pérdidas gestacionales fueron determinados durante el período. Como resultados principales se puede resumir que (i) se detectó un 65% de vaquillonas infectadas con *Leptospira* spp. al final del periodo de evaluación; (ii) previo al primer servicio reproductivo se identificaron las especies de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* como causales de infección; (iii) en cuanto a la fisiología reproductiva, las vaquillonas con diagnóstico positivo a *Leptospira* spp. tuvieron 40% más de pérdidas gestacionales tempranas que las negativas; (iv) además, el diámetro endometrial y diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas comparados entre vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp. durante la gestación, son descriptos por primera vez en el presente trabajo. Como conclusión, las vaquillonas naturalmente infectadas por *Leptospira* spp. presentan mayores pérdidas tempranas que aquellas no infectadas. Por otro lado, la infección natural por *Leptospira* spp. no causó alteraciones detectables en las estructuras ováricas ni en las uterinas, no observando tampoco diferencias en lo que respecta a la edad a la pubertad y la concepción al primer servicio.

SUMMARY

Leptospirosis is a zoonotic disease worldwide distributed that has a negative impact on reproduction, which can cause abortions and infertility with early embryonic deaths and disorders in the physiology of the estrous cycle. The objective of this study was to evaluate the reproductive physiology and performance parameters in naturally infected heifers by *Leptospira* spp. A prospective study was carried out with 60 Holstein calves negative to *Leptospira* spp. belonging to a positive property. Urine and blood were extracted from each animal from 3 to 24 months of age, on a monthly basis, for the evaluation of a possible new infection. On the other hand, different reproductive parameters such as age of puberty, estrus repetition and ovarian structures (follicles and corpus luteum) were evaluated during reproductive management. On days 30, 60, 120, 180 and 240 post insemination, B-mode and Doppler ultrasounds were performed to evaluate the fetal presence, endometrial diameter, diameter and blood supply of the corpus luteum, diameter and blood supply of the placentomes, and diameter of the uterine artery. In turn, progesterone concentrations were determined throughout pregnancy. Reproductive indices such as conception rate, repeat services, final pregnancy rate, and gestational losses were determined during the study. As main results it can be summarized that (i) 65% *Leptospira* spp. infected heifers at the end of the evaluation period; (ii) prior to the first reproductive service, the species of *L. borgpetersenii* and *L. interrogans* were identified as causes of infection; (iii) in terms of reproductive physiology, heifers with a positive diagnosis for *Leptospira* spp. had more than 40% of early pregnancy losses than negative ones; (iv) in addition, the endometrial diameter and the diameter and blood flow of the placentomas compared between positive and negative heifers to *Leptospira* spp. during pregnancy, are described for the first time in this work. In conclusion, naturally infected heifers by *Leptospira* spp. present more early losses than those not infected. On the other hand, the natural infection by *Leptospira* spp. did not cause alterations in the reproductive physiology in both, the ovarian and uterine structures and regard at puberty and conception at first service, any differences were observed.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- Cuadro I.** Detección de *Leptospira* por qPCR de la orina y muestra cérvico uterina de vaquillonas Holstein durante el periodo de desarrollo (3 – 17 meses de edad; agosto 2018 y febrero 2020) y durante período reproductivo y de gestación (15 – 22 meses de edad; octubre y diciembre 2019, enero y febrero 2020) en los animales vacunados y no vacunados contra *Leptospira*. 35
- Cuadro II.** Tasa de concepción al primer servicio en vaquillonas positivas y negativas hasta el comienzo del servicio reproductivo (julio-octubre 2019). 38
- Figura 1.** Edad al primer celo en los grupos de terneras con diagnóstico positivo y negativo para *Leptospira* spp. $P > 0.05$ entre los animales positivos y negativos. 36
- Figura 2.** Distribución de la detección de celos de las terneras entre 6 y 16 meses de edad. 37
- Figura 3.** Cantidad promedio de folículos entre los días 0 y 7 de la IATF para animales positivos y negativos. $P > 0.05$ entre animales positivos y negativos. 37
- Figura 4.** Diámetro (mm) folículo dominante al día 7 de iniciado el protocolo de IATF de las vaquillonas tanto positivas como negativas en su primer servicio reproductivo. $P > 0.05$ entre animales positivos y negativos. 38
- Figura 5.** Porcentaje de preñez total final en vaquillonas del estudio. $P = 0.3$ entre animales positivos y negativos. 39
- Figura 6.** Pérdidas reproductivas totales entre vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp. *Los valores difieren ($P = 0.005$) entre vaquillonas positivas y negativas con pérdidas reproductivas. 39
- Figura 7.** Pérdidas reproductivas durante distintos días de gestación, menor a 30 días, entre 31-60 días, entre 61-90 días y más de 90 días. * Los valores difieren ($P < 0.05$) entre vaquillonas que tuvieron pérdidas positivas y negativas para el intervalo 31-60 días. 40
- Figura 8.** Espesor del endometrio uterino (mm) en los distintos días de gestación para vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp 40
- Figura 9.** Diámetro de la arteria uterina en los distintos días de gestación para el grupo positivas y negativas para la infección por *Leptospira* spp. 41
- Figura 10.** Diámetro y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo en los distintos días de evaluación en vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp. 42
- Figura 11.** Diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas en los distintos días de evaluación en vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp. 43

Figura 12. (A) Ilustración de los placentomas (estructuras internas en los círculos) a los días 60 (1), 120 (2), 180 (3) y 240 (4) de gestación; flujo sanguíneo (puntos coloridos internos) evaluados en las vacas a través de ecografía Doppler color. (B) Regresión lineal entre diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas. [(Doppler = $15.281 + (1.805 * \text{Diámetro Placentoma})$); $r = 0.783$, $R^2 = 0.604$; $P < 0.001$]. 44

Figura 13. Concentración de progesterona entre los distintos días de evaluación para el grupo de vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp. 45

1. INTRODUCCION

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida a nivel mundial, causada por bacterias del género *Leptospira* (Picardeau, 2017; Puche et al., 2018) afectando un amplio rango de animales tanto domésticos como silvestres. Los bovinos infectados son considerados como reservorio activo de leptospiras diseminándola en el ambiente y a los trabajadores en contacto estrecho con los animales (Benschop et al., 2017; Haake and Levett, 2015).

En el Uruguay, existen estudios en animales que demuestran una alta prevalencia de exposición a *Leptospira spp.* con seropositividad individual 25-50% y una prevalencia predial de 50 -70% (Repiso et al., 2005). Más recientemente, un trabajo multidisciplinario reportó una positividad individual de excreción de leptospiras en orina del 20% y el 77% con al menos 1 animal excretando leptospiras patógenas (Zarantonelli et al., 2018).

El género *Leptospira* pertenece a la familia Leptospiraceae orden Espiroquetales (Levett, 2015). Las mismas son bacterias de forma espiralada y con doble membrana plasmática que en su membrana externa, contiene lipopolisacáridos (LPS) que constituyen uno de los principales antígenos de la *Leptospira* patógena en infecciones naturales. Los LPS de la *Leptospira* son estructural e inmunológicamente similares a los LPS de otras bacterias Gram negativas, aunque mucho menos toxico. Además, los LPS tienen un rol esencial para la sobrevivencia de la *Leptospira* tanto dentro como fuera del hospedero (Ellis, 2015).

Los bovinos son considerados hospederos de mantenimiento, caracterizados por presentar una infección crónica, sin sintomatología aparente ya que las cepas patógenas se encuentran adaptadas al huésped. Las cepas *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*, pertenecientes al sg Sejroe sv Hardjo conocidas como subtipos Hardjobovis en *L. borgpetersenii*, y Hardjoprajtino en *L. interrogans*, están particularmente adaptadas al bovino y pueden causar pérdidas reproductivas durante todo el período de gestación en hasta en un 10% (Ellis et al., 1986, 2015; Dhaliwal et al., 1996b). Por otro lado, el bovino puede ser el hospedero accidental presentando sintomatología aguda como fiebre, ictericia, insuficiencia renal y hepática pudiendo llegar hasta la muerte.

En bovinos, la leptospirosis tiene gran impacto negativo en la reproducción, provocando infertilidad a través de muertes embrionarias tempranas y repetición de estros, causando aumento de servicios por concepción e intervalos prolongados de partos, ocurrencia de abortos, partos prematuros y nacimiento de terneros débiles (Ellis, 1994; Lilenbaum and Martins, 2014). La infección persistente del tracto reproductivo puede ser la manifestación más importante de la leptospirosis, principalmente cuando está involucrado el serovar Hardjo (Ellis, 1994; Grooms, 2006; Pereira et al., 2013). A su vez, está descrito que las mismas presentan tropismo por el tracto genital bovino (Bielanski and Surujballi, 1998), pudiendo causar micro inflamaciones en las células uterinas, afectando el ambiente uterino, la concepción y el desarrollo embrionario. Cuando el bovino es infectado con la *L. interrogans* sv Pomona puede causar brotes de abortos con hasta un 30% de pérdidas en el último tercio

de la gestación (Adler and De la Peña Moctezuma, 2010). Una revisión reciente, menciona que la leptospirosis genital bovina podría ser considerada como un síndrome específico disociado de la enfermedad renal y sistémica y que la leptospirosis subclínica es la forma más común, transformándola en un síndrome desatendido (Loureiro y Lilenbaum., 2020). Por otro lado, Di Azevedo et al. (2021) demostró por primera vez la presencia de *Leptospira* spp. en ovarios de vacas asintomáticas naturalmente infectadas lo que indica una posible infección del ovocito. La patogenia exacta de la leptospirosis sobre la muerte embrionaria temprana y consecuente repetición de celos aún no está clara, pero en la literatura se ha sugerido que la presencia de *Leptospira* spp. en el ambiente uterino en distintas especies causa una inflamación local y consecuente falla reproductiva (Arent et al., 2013; Wang et al., 2014).

Por lo tanto, a raíz de la información presente en la literatura se concluye que más estudios son necesarios para buscar comprender los cambios en la fisiología reproductiva, la morfología de los ovarios, útero y placenta y parámetros de la performance reproductiva en vaquillonas expuestas a condiciones de infección natural por *Leptospira* spp.

2. REVISION DE LITERATURA

La presente sección es una revisión de la literatura sobre los principales tópicos abarcados en el presente trabajo. En primer lugar, se describen extensamente las generalidades de la leptospirosis, aspectos generales y específicos del género *Leptospira*, principales métodos diagnósticos, de control y prevención. En segundo lugar, se detalla información conocida sobre los efectos de infecciones con bacterias del género *Leptospira* sobre la reproducción en bovinos, principalmente referidos a la fisiología ovárica y uterina foco en la fertilización y la gestación de estos animales.

2.1. Generalidades de la leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida a nivel mundial, causada por bacterias del género *Leptospira* (Picardeau, 2017; Puche et al., 2018). Esta enfermedad afecta a un amplio rango de animales tanto domésticos como silvestres. Las especies patógenas del género *Leptospira* puede colonizan los túbulos renales, desde donde son luego excretadas al ambiente a través de la orina. En particular, los bovinos infectados son considerados como reservorio activo de leptospirosis y las diseminan en el ambiente y hacia los trabajadores en contacto estrecho con los animales (Benschop et al., 2017; Haake and Levett, 2015). Es una enfermedad de naturaleza estacional, pues las bacterias sobreviven mejor en ambientes cálidos y húmedos siendo por ende más prevalente en países de clima tropical o subtropical (Levett, 2001; Vijayachari et al., 2008).

2.2. Epidemiología

En el Uruguay, estudios serológicos en animales demostraron que existe una alta prevalencia de exposición a *Leptospira* spp., con seropositividad individual de 25-50% y una prevalencia predial de 50 -70% (Caffarena et al, 1971; Repiso et al., 2005). Más recientemente, un trabajo multidisciplinario realizado en distintos predios del país reportó una positividad individual de excreción de leptospirosis en orina del 20% y, en relación a los establecimientos evaluados, el 77% de los mismos tuvo al menos 1 animal excretando leptospirosis patógenas. En dicho estudio se aislaron e identificaron, mediante técnicas serológicas y moleculares: *L. interrogans* serogrupo (sg) Pomona serovar (sv) Kennewicki, *L. interrogans* sg Canicola sv Canicola, *L. borgpetersenii* sg Sejroe sv Hardjo y distintas cepas de *L. noguchii* pertenecientes a los serogrupos Autumnalis, Australis, Pyrogenes, así como de un serogrupo aún no identificado (Zarantonelli et al., 2018).

2.3. Características de la bacteria

El género *Leptospira* pertenece a la familia Leptospiraceae orden Espiroquetales (Levett, 2015). Son bacterias de forma espiralada y con doble membrana plasmática. En su membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) que constituyen uno de los principales antígenos de la *Leptospira* en infecciones naturales. El LPS de *Leptospira* es estructural e inmunológicamente bastante similar a los LPSs de otras bacterias Gram negativas, aunque mucho menos toxico y revelando sutiles diferencias en su lípido A. El LPS en *Leptospira* es

muy variable en su región conocida como antígeno O (constituida de carbohidratos) entre distintas cepas, lo cual correlaciona con la identificación de más de 300 serovares diferentes. El LPS juega un rol esencial para la sobrevivencia de *Leptospira* tanto dentro como fuera del hospedero. Aquellos serovares antigénicamente correlacionados se agrupan en serogrupos y a su vez, leptospiras pertenecientes a una misma especie pueden expresar en su superficie moléculas de LPS pertenecientes a un mismo serovar por expresar en su superficie moléculas de LPS con idéntica estructura (Levett, 2015). Hoy se conoce que existen más de 60 especies de leptospiras, que se agrupan filogenéticamente en 2 clados principales: el clado que incluye 38 especies patógenas (agrupadas a su vez en dos sub clados: P1 y P2) y un clado que incluye a las especies de vida libre o saprófitas (agrupadas en dos subclados, S1 y S2) (Vincent et al., 2019). Es importante remarcar sin embargo, que son cuatro las especies más frecuentemente aisladas de casos de leptospirosis humana y/o animal: ellas son las especies *interrogans*, *kirschneri*, *noguchii* y *borgpetersenii*, todas pertenecientes al clado P1 (Vincent et al., 2019).

En los animales existen dos tipos de hospederos: i) de mantenimiento/transmisores y ii) accidentales/incidentales (Levett, 2001). Los primeros se caracterizan por presentar una infección crónica, sin sintomatología aparente ya que las cepas patógenas se encuentran adaptadas al hospedero. Estos constituyen la principal fuente de diseminación de la enfermedad. Una vez que la bacteria ingresa en el organismo a través de mucosas o micro lesiones en la piel, coloniza el túbulo renal proximal, siendo excretada posteriormente por la orina. Así, se transmite de animal a animal por contacto directo con la orina infectada, o indirectamente a través del suelo y/o agua contaminados (Ellis, 2015). Las cepas *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*, pertenecientes al sg Sejroe sv Hardjo (Arent et al., 2013) conocidas como subtipos Hardjobovis en *L. borgpetersenii*, y Hardjoprajitno en *L. interrogans*, están particularmente adaptadas al bovino, no suelen dar signos clínicos de infección aguda y pueden causar pérdidas reproductivas en cualquier momento de la gestación (Ellis et al., 1986; Dhaliwal et al., 1996).

Por otro lado, los hospederos accidentales o incidentales pueden presentar enfermedad con sintomatología aguda como ser fiebre, ictericia, insuficiencia renal y hepática pudiendo llegar hasta la muerte (Adler and De la Peña Moctezuma, 2010). Si afectan al bovino de manera incidental como se da por *L. interrogans* sv Pomona, pueden causar brotes de abortos con hasta un 30% de pérdidas en el último tercio de gestación. Por lo general son transmitidas de forma indirecta por orina contaminada (Campero et al. 2017).

2.4. Patogénesis

Generalmente la infección por especies patógenas de *Leptospira* inicia por membranas mucosas de ojos, boca, nariz o tracto genital en contacto directo con la bacteria o por escoriaciones de la piel. Una vez que la *Leptospira* ingresa al animal tiene un período de incubación de 3-21 días seguido por una leptospiremia que puede durar aproximadamente una semana. Durante ese período es posible aislar las leptospiras de la sangre y mayoría de los órganos (Ellis, 2015). Los anticuerpos son detectados 10-14 días post infección

aproximadamente, con un pico a las 3-6 semanas multiplicándose en el organismo, pudiendo ser posteriormente detectados en excreciones del tracto génito-urinario y la glándula mamaria (Ellis, 2015). Una vez transcurrida la fase de leptospiremia, las leptospiras se ubican a nivel renal donde se multiplican y pueden persistir y eliminarse durante años de forma intermitente por orina cuya duración e intensidad varía de una especie a otra, de un animal a otro y con el serovar infectante (Ellis, 2015). El hecho de no detectar leptospiras en la orina de un animal no descarta la posibilidad de que el animal sea un portador renal crónico; simplemente indica que el animal no estaba excretando cantidades detectables de leptospiras en el momento de la prueba (Ellis, 2015). Los signos clínicos de la enfermedad dependen del serovar y el hospedador actuante (Campero et al., 2017). Otra vía de transmisión en el caso de hembras gestantes es la transplacentaria donde el agente atraviesa la placenta durante la leptospiremia. Un caso particular sería la posibilidad de infección del feto durante el momento del parto (Ellis, 1984). Cuando se ubican en el útero, las leptospiras pueden provocar abortos, mortinatos y muerte neonatal por la infección intrauterina. La patogenia de la forma reproductiva no está clara pero algunos autores sospechan que la infección transplacentaria ocurre durante un periodo muy limitado de la leptospiremia materna (Ellis, 2015). El ganado bovino es el hospedero de mantenimiento del serovar Hardjo; *L. borgpetersenii* serovar Hardjo subtipo Hardjobovis y *L. interrogans* serovar Hardjo subtipo Hardjoprajitno, siendo serológicamente indiferenciables pero genéticamente diferentes (Grooms, 2006). Bacterias con ambos genotipos pueden colonizar el tracto genital de vacas y toros pudiendo ser transmitidas de forma venérea (Campero et al., 2017), llevando frecuentemente a una infección subclínica y persistente en el tracto reproductivo (Lilenbaum and Martins, 2014; Ellis, 2015; Monte et al., 2015). Un estudio experimental realizado con infección en semen por *L. borgpetersenii* sv Hardjo en vaquillonas demuestra que estos organismos son capaces de viajar por el tracto reproductivo estableciendo una infección en el útero y el oviducto (Bielanski et al., 1998). Masri et al., (1997) reportan que *Leptospira* spp. es comúnmente eliminada por semen de toros y por lo general cursan con infección subclínica representando una potencial fuente de infección para las hembras. La presencia de este microorganismo en el tracto reproductivo y su persistencia en el oviducto y el útero en bovinos no gestantes infectados se ha demostrado de forma natural y experimental (Ellis, 1994; Bielanski and Surujballi, 1996).

2.4.1. Relevancia en la gestión de riesgos de calidad de manejo en predios lecheros

En predios lecheros que presentan la enfermedad en forma incidental, los animales pueden presentar agalactia, disminución repentina de la producción de leche, ubres blandas y flácidas, leche con apariencia amarillenta con alto recuento celular pero libre de organismos de mastitis comunes. Por lo general, los animales afectados regresan a su producción normal de leche en 10-14 días.

2.5. Métodos de diagnóstico

Existen diferentes métodos de diagnóstico para la leptospirosis. Por un lado, las técnicas indirectas, donde se detectan los anticuerpos contra *Leptospira* y por otro las directas donde se detecta el microorganismo. La serología es una herramienta útil ya que puede detectar la presencia de leptospiras a nivel predial, pero es inadecuada para la detección de leptospirosis individual, para esto se utilizan métodos de detección directos como la PCR o el cultivo (Hernández-Rodríguez et al., 2011; Otaka et al., 2012).

Existe variación en la duración de la excreción de leptospiras en orina informada por diferentes autores, lo que puede deberse en parte a diferentes sensibilidades en las técnicas de detección, número y virulencia de los organismos en la dosis infecciosa, edad, susceptibilidad y respuesta inmune del huésped (Leonard et al., 1993).

2.5.1. MAT

La prueba de aglutinación microscópica (Microscopic Agglutination Test, MAT) es el test serológico de referencia, ampliamente utilizado en bovinos a nivel mundial, siendo el recomendado por la OIE (OIE, 2018; Smith et al., 1994). Es una técnica que no permite la detección de serovares infectantes, para lo cual resulta imprescindible el aislamiento y posterior caracterización fenotípica y genotípica. Consiste en la detección de anticuerpos aglutinantes mediante la incubación de suero del animal a evaluar, con un panel de antígenos vivos constituido por cepas de diferentes serovares de *Leptospira* representativos de los serovares circulantes para la región (Levett, 2003). Esta técnica tiene ciertas limitaciones como ser: i) baja sensibilidad en su diagnóstico para identificar al portador renal o genital crónico donde los títulos de anticuerpos (AC) son estáticos o están disminuyendo, ii) no diferencia AC provenientes de inmunizaciones con el uso de vacunas de aquellos generados por la infección natural, iii) no permite diagnosticar el serovar actuante por ser muy común la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes serovares, principalmente en las primeras semanas de infección (Ellis, 2015). Una reacción de aglutinación es considerada positiva cuando muestra un 50% de aglutinación, dejando 50% de células libres, respecto al control sin aglutinar que es el que contiene la bacteria (OIE, 2018). Cuando existen abortos por serovares incidentales por (ej: *L. interrogans* sv Pomona), en la serología por MAT de vacas que abortaron se observan títulos mayores o iguales a 1600. Cuando los abortos son por serovares de mantenimiento como (ej: *L. borgpetersenii* sv Hardjo) los títulos son bajos e incluso negativos (100 o menores) (Campero et al., 2017). La interpretación de los resultados serológicos puede ser complicada o confundida post vacunación. Por lo general, la duración de títulos de AC aglutinantes por vacunas es entre 1-3 meses post vacunación y los títulos de MAT varían de 1:100 – 1: 400 (Campero et al., 2017).

Un trabajo en yeguas reporta que la serología demuestra no ser adecuada como método de diagnóstico de la *Leptospira* para la detección de portadores genitales, debido a que cuando se ubican en útero, están más protegidas contra el sistema inmunológico del huésped

lo que conduce a una respuesta humoral más débil, por lo que se deben fomentar los métodos de detección moleculares (Hamond et al., 2015).

2.5.2. PCR y qPCR

El diagnóstico molecular está siendo cada vez más utilizado gracias al advenimiento de las tecnologías asociadas a la detección de ADN de las especies patógenas de *Leptospira*. Es una técnica con alta sensibilidad y especificidad, que se realiza de forma rápida y que tiene como ventaja que no utiliza organismos vivos. Existen a su vez, variantes de la PCR convencional como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), siendo una técnica que, además de la detección del microorganismo, es más rápida y menos vulnerable a la contaminación, pero es más costosa. Un diagnóstico positivo a PCR demuestra la presencia de leptospirosis patógenas pero no permite la identificación directa del serovar (Ellis, 2015). Tanto en la PCR convencional, o de tiempo final, como en la PCR en tiempo real, se utiliza frecuentemente el gen lipL32 como marcador de detección de especies patógenas de *Leptospira* (Hamond et al., 2014; Fouts et al., 2016). Se ha demostrado que la PCR en orina debe considerarse y fomentarse como una herramienta cada vez más útil para un diagnóstico preciso de la leptospirosis en el ganado (Hamond et al., 2014).

Basados en la detección de genes presentes en bacterias se han identificado el gen *rrs* que codifica para el RNA ribosomal 16 S, así como el gen *secY* (Ellis, 2015), como blancos útiles para la identificación de leptospirosis a partir de muestras de ADN extraídas de bacterias en cultivo así como a partir de muestras biológicas (Bourhy et al., 2013). El gen *rrs* fue el primer marcador genético utilizado en la identificación de especies de *Leptospira* y se utilizó como blanco para diagnóstico por PCR. Sin embargo, por ser un marcador de género, requiere de un paso posterior de secuenciación para poder identificar la especie infectante. Además, existen genes que no están presentes en especies de vida libre o saprófitas, y que por ende permiten la detección de leptospirosis patógenas, tal como es el caso del gen *lipL32* que codifica para una lipoproteína específica de especies patógenas (Nieves, 2018).

Una limitación que presenta esta técnica para el diagnóstico a nivel individual es que un único resultado negativo no significa que el animal no esté infectado dado que la eliminación por orina ocurre típicamente de forma intermitente en el ganado (Adler and De la Peña Moctezuma, 2010).

2.5.3. Otras técnicas

El test serológico por ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) también puede ser de utilidad para la detección de AC contra *Leptospira*. Esta técnica tiene como ventaja la objetividad en sus resultados, rapidez y reproductibilidad permitiendo procesar muestras a gran escala. En animales vacunados frente al serotipo pertinente pueden existir falsos positivos de infección en algunos ELISA, dificultando así la interpretación de los resultados. Para la identificación de predios infectados por el serovar Hardjo o para programas de control/erradicación, se desarrollaron test de ELISA para su uso en leche de vacas

individuales o en leche de tanque para la detección de anticuerpos contra serovar Hardjo (Ellis, 2015).

Por otro lado, si bien las especies patógenas de *Leptospira* se pueden cultivar en medios de cultivo específicos a partir de orina de animales infectados, el cultivo microbiológico no es utilizado de rutina como método de diagnóstico (Dhaliwal et al., 1996) dado que la velocidad de crecimiento de estas bacterias puede ser muy lento, con lo que el desarrollo de un cultivo positivo puede llevar entre 16 y 26 semanas. Sin embargo, el aislamiento de la bacteria con la posterior identificación de la especie y/o serovar es de suma utilidad para conocer cuáles son las variantes que están causando la enfermedad en determinada región. (Ellis and Thiermann, 1986; Ellis, 2015).

2.6. Métodos de control/prevenición

El control de la enfermedad puede ser necesario no solamente para controlar la infección sino para disminuir el riesgo zoonótico. Para intentar controlar una enfermedad es necesario tener información en lo que respecta a la cantidad de animales y especies afectadas, los serovares actuantes, los huéspedes de mantenimiento, medios de transmisión, factores de riesgo y los métodos de control disponibles (Ellis, 2015).

El tratamiento con antibióticos es un método de control que elimina las leptospiras de los tejidos y detiene la leptospiruria en animales crónicamente infectados, proporcionando también un medio de protección de los animales susceptibles al limitar la carga de *leptospiras* en el ambiente hasta que, en caso de implementada como medida de control, la vacunación induzca una inmunidad protectora contra la infección (Alt et al., 2001).

2.6.1. Vacunación

La vacunación contra leptospirosis se utiliza como método de prevención y control de la enfermedad pudiendo reducir significativamente la diseminación de la bacteria a través de la orina. En bovinos es utilizada ampliamente y pueden contener de uno y hasta más de 5 serovares. Las vacunas anti-leptospira son bacterinas, es decir suspensiones de leptospiras enteras inactivadas de tal forma que su actividad inmunógena se conserva, siendo el LPS el antígeno inmunodominante. La OIE recomienda que en la fabricación de las vacunas anti-leptospira se incluyen todos los serovares que circulan en una región dada, debido a que distintos serovares confieren poca o nula protección cruzada o heteróloga (Ellis, 2015; OIE, 2018).

Existen vacunas combinadas que además de la protección contra *Leptospira* spp., contienen otros antígenos que protegen contra patógenos causantes de enfermedades reproductivas, dentro de los cuales están: Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) y Herpes bovino tipo 5 (BHV-5), virus de la Diarrea viral bovina tipo 1 y tipo 2; *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus venerealis biotipo intermedius*.

Se ha sugerido que la vacunación brinda efectos beneficiosos disminuyendo las tasas de infección y aborto en animales naturalmente infectados. A pesar de necesitar más estudios,

la vacunación parece estar asociada con una mejora de la tasa de fertilidad (Dhaliwal et al., 2011). Si la infección placentaria ocurrió previo a la vacunación, incluso las mejores vacunas pueden no proteger al feto (Ellis, 2015). Por otro lado Libonati et al., (2018) reportan que la vacunación contra leptospirosis es una herramienta de gran utilidad para evitar la repetición de estros en los bovinos.

2.7. Efectos de la infección por *Leptospira* spp sobre la reproducción bovina

En bovinos, la leptospirosis tiene gran impacto negativo en la reproducción, provocando infertilidad a través de muertes embrionarias tempranas y repetición de estros, causando aumento de servicios por concepción e intervalos prolongados de partos, ocurrencia de abortos, partos prematuros y nacimiento de terneros débiles (Ellis, 1994; Lilenbaum and Martins, 2014). En la literatura también está descrita la presencia de animales con mastitis de ubres flácidas con secreción amarillenta o sanguinolenta, así como también agalactia en predios lecheros (Campero et al., 2017). La infección persistente del tracto reproductivo puede ser la manifestación más importante de la leptospirosis principalmente cuando está involucrado el serovar Hardjo (Ellis, 1994; Grooms, 2006; Pereira et al., 2013). La leptospirosis puede causar abortos en las vacas preñadas y, dependiendo del serovar actuante, el porcentaje y el momento de la gestación que se den dichas pérdidas. Aquellos abortos causados por serovares de *Leptospira* spp adaptados al bovino como hospedero de mantenimiento (ej: sv Hardjo) pueden ocurrir durante toda la gestación variando entre 3-10% en rodeos endémicos; mientras que aquellos causados por serovares que infectan al bovino como hospedero accidental (ej: sv Pomona) suceden principalmente en el último tercio de la gestación llegando hasta un 30% (Ellis, 1984). Las leptospiras del sv Hardjo presentan tropismo por el tracto genital bovino (Bielanski and Surujballi, 1998), pudiendo causar micro inflamaciones en las células uterinas, afectando el ambiente uterino, la concepción y el desarrollo embrionario. A pesar de que la patogenia exacta de la leptospirosis sobre la muerte embrionaria temprana y consecuente repetición de celos aún no está clara, se ha sugerido que la presencia de *Leptospira* spp. en el ambiente uterino en distintas especies causa una inflamación local y consecuente falla reproductiva (Arent et al., 2013; Wang et al., 2014). Loureiro y Lilenbaum (2020) mencionan en un trabajo reciente que, probablemente la colonización de leptospiras en el útero generan una inflamación local, perjudicando la implantación embrionaria o causando daño embrionario llevando entonces a la muerte del mismo. En lo que respecta a la transmisión transplacentaria de la enfermedad, a pesar de existir poca información al respecto, hay autores que mencionan la transmisión madre-ternero pudiendo causar partos de terneros prematuros, mortinatos, nacimiento de terneros débiles y con bajo peso al nacimiento (Smyth et al., 1999). Varios estudios en una revisión reciente, mencionan que la leptospirosis genital bovina podría ser considerada como un síndrome específico dissociado de la enfermedad renal y sistémica y que la leptospirosis subclínica la forma más común, transformándola en un síndrome desatendido (Loureiro and Lilenbaum 2020). Por otro lado, el aborto puede ocurrir durante la fase aguda en el comienzo

de la infección, para luego hacerse crónico y silente, caracterizado principalmente por mortalidad embrionaria, con repetición de celos e infertilidad (Aymée et al., 2021).

2.7.1. Aspectos en la fisiología uterina y ovárica

Los bovinos son animales poliéstricos con ciclos estrales cada 21 días promedio (17-24 días) (Colazo and Marpletoft, 2014). Cada ciclo estral está compuesto de ondas foliculares con dos fases; una folicular (estrogénica) y otra lútea (progestacional). Durante la fase folicular se da la maduración del folículo que domina y es el encargado de ovular mientras los demás se degeneran (Ginther et al., 1989), existiendo un aumento en las concentraciones de estradiol provenientes del folículo dominante preovulatorio induciendo un pico de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que permite el comportamiento estral donde las hembras son sexualmente receptivas y permiten ser montadas (Stevenson, 2006). Este pico de GnRH preovulatorio induce el pico de la hormona luteinizante (LH) permitiendo la ovulación de dicho folículo formándose así el cuerpo lúteo (CL) siendo el encargado de la secreción de la Progesterona (P4), la hormona predominante durante este período (Colazo and Marpletoft, 2014) cuya función es preparar al endometrio uterino para la implantación y mantenimiento de la preñez temprana (Kojima, 2003). Dicha hormona llega a niveles en plasma <1 ng/mL en el día 3 post-ovulación, 3 ng/mL al día 6 aproximadamente alcanzando su punto máximo en el día 10-14 post ovulación, alcanzando niveles >4 ng/mL. En el día 17, los niveles de P4 disminuyen debido a la luteólisis inducida por la prostaglandina F 2α (PGF 2α) liberada desde el endometrio de hembras no gestadas (Adams et al., 2008). En el caso de las hembras preñadas, los niveles de P4 permanecen elevados (Niswender et al., 2000). Todo el proceso de desarrollo folicular es coordinado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, donde las hormonas GnRH, LH, FSH, estradiol y P4 tienen un rol central en la manutención de la actividad reproductiva (Amstalden and Williams, 2014).

Un trabajo reciente por Di Azevedo et al., (2021) mencionan por primera vez la presencia de *Leptospira* spp. en ovarios de vacas asintomáticas naturalmente infectadas lo que indica una posible infección del ovocito. En un trabajo previo se mencionó que existe posibilidad de obtener embriones de estadio transferible de ovocitos recuperados de donantes infectadas y de ovocitos expuestos a la bacteria de forma *in vitro* (Bielanski and Surujballi, 1996). Bielanski y Surujballi (1998) en un estudio *in vitro* demostraron que la *L. borgpetersenii* sv Hardjo es capaz de adherirse a la zona pelúcida de embriones fecundados y ser transmitida a la madre receptora, ya que el procedimiento de lavado recomendado por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) no libera ovocitos y embriones de este patógeno.

2.7.2. Aspectos sobre la fertilidad

La pubertad se da cuando el animal adquiere la madurez reproductiva involucrando cambios fisiológicos y de comportamiento (Amstalden and Williams, 2014). El comienzo es la primera oportunidad para una vaquillona de quedar preñada y debe ser definido como la primera ovulación seguida de una fase luteal de duración normal. Es un proceso fisiológico

que requiere de la maduración del sistema neuroendocrino con la posterior secreción de GnRH y LH (Cardoso et al., 2018). Se inicia en primer lugar con el aumento en la secreción pulsátil de GnRH a nivel hipotalámico (Cardoso et al., 2014) con posterior aumento en los pulsos de LH cada 40-50 minutos estimulando la madurez de los folículos ováricos, y un aumento en la concentración circulante de estradiol con posterior pico de LH que induce a la primera ovulación y posterior luteinización del folículo dominante (Kinder et al., 1987). A pesar de que el estro de la pubertad es la primera oportunidad de una vaquillona para quedar preñada, la fertilidad no es óptima en ese momento (Byerley et al., 1987). La llegada de la pubertad depende de varios factores, como ser la edad, el genotipo, la estación del año, la nutrición y el peso corporal entre los factores más importantes. Generalmente se da cuando la vaquillona llega al 60% de su peso adulto (Larson, 2007) y con un promedio de edad de 261 días (entre 234 y 301 días) (Davis Rincker et al., 2011; Manthey et al., 2017).

El ovario es responsable de la producción de ovocitos y de la síntesis de hormonas sexuales (estrógenos y progesterona), las cuales promueven y regulan la fertilización del ovocito y el mantenimiento de la gestación. Al nacimiento, el número de folículos y ovocitos en los ovarios varía de 10.000 a 350.000 y para el año de edad, las vaquillonas pierden aproximadamente el 80% del stock sano inicial de ovocitos (Erickson, 1966). Durante el ciclo estral de las vacas, el número de folículos antrales (>3 mm de diámetro) varía ampliamente entre las mismas, fluctuando entre 5 y 50 en una onda folicular entre ambos ovarios (Sartorelli et al., 2005). Esta característica es repetible en la misma vaca, y está correlacionada positivamente con el número total de folículos viables y con la fertilidad (Adams et al., 2008).

El líquido folicular proporciona un microambiente para los ovocitos que, en parte, va a ser el responsable de la calidad del futuro embrión y a su vez proporcionar protección durante la ovulación. Es producto tanto de la transferencia de componentes del plasma sanguíneo que atraviesan la barrera folicular sanguínea como de la actividad secretora de las células granulosas y tecaes (Gosden et al., 1988). Existen estudios que mencionan la presencia de *Leptospira* spp en fluidos foliculares y lavados oviductales de vaquillonas infectadas de manera experimental (Bielanski and Surujballi, 1996).

La tasa de preñez del rodeo es el producto de la tasa de detección de celos por la tasa de concepción. La tasa de detección de celos es la relación entre los animales detectados en celo y el total de los que efectivamente están ciclando y la tasa de concepción es el porcentaje de preñez obtenido sobre las que se sirvieron. Cualquier disminución en uno de ellos afecta drásticamente el porcentaje de preñez. Se utilizan protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) para evitar la escasa eficiencia en la detección de celos en los rodeos (Cutaia and Bo, 2007). A pesar de permanecer poco clara, Libonati et al. (2018) mencionan que la insuficiencia reproductiva y la repetición de estros es el problema reproductivo más importante asociado a la leptospirosis, lo que lleva al aumento de la cantidad de servicios por concepción y prolongando el intervalo entre partos (Ellis, 2015). Por otro lado Muniz

Oliveira et al., (2021) mencionan que la muerte embrionaria es definida como el problema reproductivo más frecuentemente asociado a seroreactividad positiva contra determinadas cepas del serogrupo Sejroe y que por otro lado, los abortos están asociados con seroreactividad positiva al serogrupo Icterohaemorrhagiae.

La inseminación de las vaquillonas puede ser con semen convencional o semen sexado. Se cree que la capacidad de fertilización de los espermatozoides sexados se reduce mediante la clasificación por citometría de flujo del 60 al 90% de la de los espermatozoides sin clasificar (Healy et al., 2013). Distintos estudios en vaquillonas reportaron que las tasas de preñez varían entre un 31-60% con semen sexado y 54-89% con semen convencional (Kurykin, 2017). Esta diferencia se debe al reducido potencial de fertilidad atribuido a la menor cantidad de espermatozoides por dosis de inseminación y al daño de los espermatozoides por el proceso de clasificación (Seidel, 2014).

2.7.3. Aspectos sobre la gestación

La gestación comienza en la unión del ovocito con el espermatozoide y en el bovino dura 283 días (243-316) en promedio. Es conocida por presentar dos periodos: embrionario que va desde la fertilización hasta los 45 días de gestación y período fetal que va desde el día 46 hasta el parto (Bartolomé, 2009). A los 4-5 días de la fertilización, el embrión pasa al útero perdiendo posteriormente la zona pelúcida (6-13 días). A los 16-17 días de gestación, el concepto es el encargado de dar la señal ante la presencia del feto. Si existe muerte embrionaria antes del día 16, la vaca va a ciclar al día 18 a 24 como si nunca hubiera ocurrido concepción, si se da luego de ese período la vaca tendrá un ciclo prolongado, denominándose muerte embrionaria hasta el día 45 y si la muerte ocurre del día 46 en adelante se denomina muerte fetal. En este período es que, a pesar de no estar completamente entendido existen estudios que mencionan que *Leptospira* spp puede persistir en el oviducto y útero interfiriendo con la implantación embrionaria (Ellis and Thiermann, 1986) y otros eventos de la preñez temprana causando infertilidad por la incapacidad de mantener el concepto y es asociado con un aumento de servicios por concepción y un intervalo entre partos prolongado (Grooms, 2006). Una herramienta fundamental especialmente para la detección de muertes embrionarias tempranas es el cálculo de intervalos entre celos donde; si presenta celos de 2 a 17 días es considerado como “corto”, de 18-24 “normal”, de 25 a 35 “ciclo anormalmente largo”, 36 a 48 días “celo no detectado” y 49 o más días, dos celos perdidos o bien muertes embrionarias o abortos (Cavestany 1993).

Por otro lado, se sabe que el rol de la placenta y el CL son esenciales para mantener la gestación (Bartolomé, 2009; Adeyinka et al., 2014) pudiendo verse afectadas ante la presencia de *Leptospiras* patógenas (Fávero et al., 2017), capaces de generar luteólisis prematura y placentitis como consecuencia de la invasión bacteriana en la unidad fetoplacentaria (Campero, 2017). *Leptospira* spp sv. Hardjo puede causar retención placentaria post parto (Grooms, 2006) pudiendo encontrarse también lesiones de los

endotelios vasculares con posibles áreas de isquemia (Adler and De la Peña Moctezuma, 2010; Alonso-Andicoberry et al., 2001a).

La placenta es un órgano que contiene componentes maternos y fetales de suma importancia, ya que posee funciones alimenticias, respiratorias, excretoras, inmunológicas y endócrinas durante la vida prenatal. Consta de un componente fetal derivado del corion y un componente materno derivado del endometrio uterino brindándole al embrión una nutrición y protección adecuadas durante su desarrollo. La placenta de los rumiantes está descrita como cotiledonaria sinepiteliocorial (Peter, 2013) basada en el número de capas de la barrera placentaria y vellosa según morfología de las vellosidades coriónicas (Barbeito and Alvarado, 2017). Posee a su vez, múltiples áreas focales de contacto entre los sistemas sanguíneos materno y fetal, conocidos como placentomas compuestos por carúncula materna y cotiledón fetal. Los placentomas pueden ser observados mediante ultrasonografía para estimar la edad fetal (Adeyinka et al., 2014). A partir del día 37 son macroscópicamente observables encontrando no más de 20 placentomas y, a medida que pasan los días van aumentando en número llegando a triplicarse al día 45. Al día 70 de gestación se encuentran aproximadamente 80-90 placentomas, variando en tamaño según su ubicación, encontrando los de mayor tamaño cerca del cuerno uterino gestado, más específicamente cerca de la mitad de dicho cuerno y de la arteria uterina media (Peter, 2013). A los 4 meses de gestación, cuando ya están completamente formados y miden aproximadamente 10-12 cm de largo, 2-3 cm de espesor y hay entre 75-140 placentomas. Existen estudios que mencionan que *Leptospira* spp. eventualmente puede cruzar la placenta, a través de los placentomas, invadiendo al feto, llevándolo a la muerte y consecuentemente al aborto; pero más estudios son necesarios para evaluar el papel de las mismas sobre las pérdidas (Plunkett et al., 2013).

En bovinos, una herramienta de gran utilidad es la ultrasonografía modo B, pues permite la visualización no invasiva de los órganos reproductores. Esta técnica brinda información valiosa y de forma temprana en lo que respecta al diagnóstico de gestación. Con esta técnica se puede evaluar e incluso tomar medidas de la morfología de órganos reproductores como por ejemplo del ovario, observando folículos y CL, así como del útero observando los placentomas. Para el caso de la funcionalidades de dichos órganos, como la perfusión vascular, ésta técnica no brinda información (Amstalden and Williams, 2014). Es por esto que la ecografía modo Doppler está siendo cada vez más utilizada para poder así observar cambios en la irrigación sanguínea de los órganos, dentro de los cuales se encuentra el útero y ovarios. Es una técnica que se utiliza para evaluar cambios que ocurren tanto en la circulación uterina durante el ciclo estral y la preñez (Bollwein et al., 2000, 2002) como en la irrigación sanguínea ovárica (Acosta et al., 2002, 2003; Miyamoto et al., 2005). El flujo sanguíneo observado se evalúa de forma cualitativa y subjetiva, según el número de píxeles observados en la ultrasonografía Doppler. Sin embargo, hasta la fecha, la información acerca de las enfermedades que afectan la gestación y que impactan sobre el flujo sanguíneo de las estructuras placentarias es escaso.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida a nivel mundial que afecta a los bovinos y también causa un impacto negativo en la reproducción, expresados por abortos, muertes embrionarias tempranas y estros irregulares. La patogenia exacta de la leptospirosis sobre la mortalidad embrionaria temprana aún no está clara, pero en la literatura se sugieren distintas hipótesis como que puede causar inflamación local y consecuente falla reproductiva, llevando a muerte fetal a causa de la infección placentaria por una septicemia.

Por otro lado, se sabe que hay riesgo de infección transplacentaria sin muerte fetal, derivando en nacimientos de terneras positivas a *Leptospira* spp. Estas terneras, que son los futuros reemplazos del rodeo, pueden tener su desarrollo y performance reproductiva comprometidos. En la literatura, hay escasa información acerca de la infección natural por *Leptospira* spp. en terneras jóvenes, especialmente enfocada en el estudio de la fisiología reproductiva. Por lo tanto, se hacen necesarios más estudios en este sentido, para desarrollar herramientas que mejoren el manejo y control sanitario de *Leptospira* spp. en las vacas con el compromiso de la lactación y en sus siguientes partos.

A raíz de la información en la literatura, el presente trabajo se propuso ahondar sobre la existencia postulada de tropismo de *Leptospira* spp. por el tracto genital. Y nos formulamos también la pregunta, ¿las estructuras ováricas y uterinas en las hembras bovinas naturalmente infectadas por *Leptospira* spp., presentan cambios morfológicos?

4. HIPOTESIS

Hembras bovinas naturalmente infectadas por *Leptospira* spp. durante el período de desarrollo reproductivo presentan alteraciones morfológicas de las estructuras del tracto reproductivo y consecuentemente tienen una performance reproductiva afectada.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la fisiología, la morfología de los genitales internos con enfoque en los ovarios, útero y placenta y parámetros de la performance reproductiva en vaquillonas expuestas a condiciones de infección natural por *Leptospira* spp.

5.2. Objetivos específicos

- a. Determinar mensualmente la cinética de infección por *Leptospira* spp en condiciones de exposición natural en hembras Holstein desde los 3 meses hasta los 24 meses de edad;
- b. Evaluar el inicio de pubertad y la expresión de celo mediante la observación diaria post inseminación para tener en cuenta posibles pérdidas tempranas entre vaquillonas infectadas y no infectadas;
- c. Evaluar el potencial de fertilidad mediante el contaje total de folículos (TFC), tamaño del mayor folículo dominante previo al primer servicio mediante ecografía modo B y características hemodinámicas del folículo dominante mediante ecografía modo Doppler color entre vaquillonas infectadas y no infectadas;
- d. Evaluar el espesor endometrial y el diametro de los placentomas mediante ecografía modo B y características hemodinámicas de los placentomas mediante ecografía modo Doppler color durante la gestación entre vaquillonas infectadas y no infectadas;
- e. Determinar las pérdidas embrionarias y fetales durante el período de gestación entre vaquillonas infectadas y no infectadas;
- f. Medir el nivel de P4 circulante al día 30, 60, 120, 180 de gestación entre vaquillonas infectadas y no infectadas;
- g. Describir la tasa de concepción al primer servicio, total de servicios por concepción, la tasa de preñez final y las pérdidas gestacionales entre vaquillonas infectadas y no infectadas.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Diseño experimental y manejo de los animales

El estudio fue realizado entre agosto 2018 y febrero 2020, en la Estación Experimental de INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) La Estanzuela, Colonia, Uruguay, Ruta 50 km 11 (34° 27' S, 57° 50' W), siguiendo los requerimientos internacionales, nacionales e institucionales para el cuidado y uso de animales. Todos los procedimientos en estudios con animales fueron de acuerdo con los estándares éticos de la institución debidamente aprobados por el Comité de Uso de Animales CEUA-INIA (protocolo #2018.2C) e inscripto ante la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) de Uruguay (registro #0009/11).

Inicialmente, se realizó un “*screening*” de predio en animales adultos para la confirmación de la presencia de *Leptospira* en el rodeo de INIA-LE. Luego de confirmar la presencia de vacas adultas excretoras de leptospiras en orina, 88 terneras Holstein entre 3-6 meses de edad, nacidas en el predio en el año 2018, fueron testeadas para la identificación de animales libres de infección mediante la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* spp en suero sanguíneo por MAT y de ADN de leptospiras patógenas en muestras de orina por qPCR entre los meses de agosto y diciembre 2018. A partir de las terneras que fueron negativas para ambos test y en dos testeos independientes, se seleccionaron de forma aleatoria 60 animales (160 kg PV promedio) para ser incluidos en el proyecto. Se dividieron al azar en dos grupos de 30 animales cada uno. Se aplicó una vacuna comercial anti leptospira a uno de los grupos (vacunados) y el otro grupo no la recibió (control). La vacuna comercial utilizada se comercializa para proteger contra Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB), Campilobacteriosis y Leptospirosis (incluyendo bacterias inactivadas *L. interrogans* serovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo subtipo Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi y Wolffi; y *L. borgpetersenii* sv Hardjo subtipo *Hardjobovis*). El protocolo de vacunación utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante: primera vacunación a las terneras de 3-6 meses de edad (los animales presentaban 150-250 kg; noviembre 2018), segunda dosis a los 30 días posteriores a la primera dosis de vacunación (diciembre 2018), revacunación a los 6 meses de la segunda dosis (250-350 kg de peso vivo (PV); junio 2019)) y revacunación anual (vaquillonas de 15-16 meses con aproximadamente 400-500 kg PV; noviembre 2019).

Se estudió la cinética de la infección por *Leptospira* spp en condiciones de exposición natural al agente (las terneras compartían predio con los animales adultos en los que se habían identificado previamente animales excretores de *Leptospira* spp). Para ello, se colectaron muestras de suero sanguíneo y orina mensualmente (diciembre 2018-febrero 2020), para la realización de MAT y qPCR para respectivamente detectar anticuerpos anti-leptospira y presencia de bacterias en orina. A su vez, se registró el peso de los animales para evaluar su desarrollo durante el proyecto (balanza Tru-test ID3000, Nueva Zelanda).

A partir de los 6 meses de edad, se comenzó a observar y evaluar distintas características reproductivas en las vaquillonas: (1) primer detección de celo = edad pubertad; (2) regularidad de celos pre inseminación; (3) ecografías pre y post servicio de (3.1) los ovarios: (3.1.1) folículos: conteo total y diámetro, y (3.1.2) cuerpo lúteo: presencia para evaluar ciclicidad, diámetro y flujo sanguíneo post servicio; y (3.2) del útero: (3.2.1) endometrio: diámetro promedio, (3.2.2) placentomas: diámetro y flujo sanguíneo, (3.2.3) presencia fetal, y (3.2.4) diámetro de la arteria uterina. En todos los días de evaluación post servicio se extrajo sangre para evaluación de concentración de progesterona. Además, se calcularon distintos índices reproductivos como: tasa de concepción, repetición de servicios, tasa de preñez final y pérdidas gestacionales durante el periodo de servicio reproductivo y gestacional. Toda la metodología empleada en el diseño experimental aquí descrito está detallada en la secuencia.

6.1.1. *Colectas de sangre y orina*

Mensualmente se colectó sangre por venopunción coccígea en tubos sin aditivos (16 x 100 mm, 10 ml) utilizando tubos Vacutainer (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) que posteriormente fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Taufkirchen, Germany) para separación del suero, obteniéndose dos muestras que se colocaron en microtubos de 1.5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y guardadas a -20°C debidamente rotuladas para posterior análisis.

Las muestras de orina fueron colectadas en tubos cónicos de 10ml (Corning™ Falcon™, Taufkirchen, Germany) mediante masaje vulvar. Las muestras luego fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante de cada muestra preservando el pellet que se lavó con 10 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se re suspendió el pellet en un microtubo de 1.5 ml con 1 ml de PBS, agitándolo y realizando nuevamente la centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos (Eppendorf, Centrifuge 5424 R). Como última etapa, se eliminó el sobrenadante y el pellet de las muestras fue almacenado en freezer -20°C debidamente identificadas para posterior extracción de ADN y análisis (Zarantonelli et al., 2018).

6.1.2. *Detección e identificación de Leptospira spp.*

Las muestras extraídas de forma mensual tanto de orina como de suero sanguíneo, conservadas a -20°C, fueron procesadas en conjunto con el Laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur-INIA (UMPI) en el Institut Pasteur de Montevideo, para análisis por qPCR y MAT, respectivamente. En los muestreos correspondientes a los primeros 7 meses del estudio se inocularon tubos con medio de cultivo EMJH para intentar el aislamiento por cultivo microbiológico de *Leptospira* spp.

6.1.2.1. *Detección de ADN de Leptospiras patógenas por qPCR*

6.1.2.2. MAT

La técnica MAT fue realizada utilizando muestras almacenadas de suero sanguíneo para la determinación de títulos aglutinantes de anticuerpos anti- *Leptospira*. Se realizó esta técnica acorde a la guía de la Organización Mundial de la Salud (OIE, 2018) para evaluar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en el suero sanguíneo de los animales en estudio. Para la selección de los animales a incluir en los dos grupos en estudio, se enfrentó el suero de cada animal con una suspensión de antígenos de *Leptospira* spp. representativos los 24 serogrupos incluyendo como antígenos aislamientos autóctonos representativos de los serogrupos circulantes en la región. Se determinó el título aglutinante mediante microscopía de campo oscuro utilizando como un título de corte 50.

6.1.2.3. Aislamientos

Los aislamientos se realizaron según metodología previamente descrita (Zarantonelli et al., 2018). Los cultivos se realizaron a partir de la orina extraída de las vaquillonas al primer servicio reproductivo (julio 2019). Se inocularon 100 µL de orina en 5 mL de EMJH para cultivo y se incubaron a 29 ° C y se monitoreó semanalmente el crecimiento bacteriano bajo un microscopio de campo oscuro durante un máximo de 6 meses. Tan pronto como crecieron bacterias similares a espiroquetas en cultivos específicos, se confirmó el crecimiento de una especie patógena de *Leptospira* mediante amplificación por PCR del gen lipL32 (Zarantonelli et al., 2018). Por otro lado, se realizó previo al primer servicio reproductivo, extracción de muestras cérvicouterinas mediante cytobrush (Minitube, GmbH, Tiefenbach, Germany) de aquellas vaquillonas positivas a *Leptospira* spp. hasta ese momento. La técnica utilizada fue la previamente descrita por Kasimanickam et al. (2004).

6.2. *Evaluación de características fisiológicas reproductivas*

6.2.1. *Edad al primer celo y expresión de celo diariamente*

A partir de los 6 meses de edad se comenzaron a realizar recorridas diarias en el potrero donde se encontraban las vaquillonas para la posible detección de celo y así registrar la edad de la pubertad con el auxilio de parches (Estrotec™ Heat Detector, USA) colocados en la base de la cola donde el color gris es el original = sin celo, y naranja completo = celo. Además de la ayuda de los parches, se observó también el comportamiento de los animales en caso de estar en celo; como ser: monta a las demás vaquillonas, lamer y oler el área genital, apoyo del mentón, como fue descrito anteriormente (Sveberg et al., 2011). Una vez registrado el dato de la edad al primer celo, se continuó con la recorrida diaria con el objetivo de tener registro de la cantidad de celos previo al primer servicio reproductivo a los 14 meses y la frecuencia entre los celos incluso post inseminación.

6.2.2. Evaluación de ciclicidad por ecografía y protocolo reproductivo

Con aproximadamente 13-14 meses de edad y 340 kg de peso, se realizó un monitoreo mediante ultrasonografía para evaluar si las vaquillonas presentaban CL en uno de los ovarios y se clasificó como cíclicas (presencia del CL) o no cíclicas (ausencia del CL). Se realizó el protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) conocido como Ovsynch (Pursley, 1996) para todos los animales del estudio. Al día 0: inyección de 100 mg de GnRH i.m. (Fertagyl - MSD Animal Health, México); al día 7, inyección de 25 mg de cloprostenol i.m. (Estrumate, Intervet, Friesoythe, Alemania); y al día 9, inyección de 100 mg de GnRH i.m. e inseminación 16 horas post inyección GnRH (día 10). Tres días después de la primer IATF, se siguieron realizando recorridas diarias para observar posibles celos y en caso de observarse, se re-inseminó a celo visto. Las inseminaciones se realizaron siempre por el mismo operador con semen sexado para la primer inseminación y semen convencional para las re-inseminaciones. El uso de dicho semen fue realizado debido al manejo ya establecido en el predio.

6.2.3. Ecografías

Las ecografías se realizaron con un equipo portátil (Sonoscape S9V Bedford Hill, NY, USA) conectado a una sonda transrectal lineal de 5.0-10.0 MHz / 46 mm, y manteniendo constante los ajustes de frecuencia y ganancia (110 para modo B y 28 para modo Doppler color) durante todo el estudio. Todas las ecografías fueron realizadas por el mismo operador en modo B y modo Doppler. Los registros ecográficos de ovarios y útero se realizaron: pre-servicio, en los días 0 y 7 de iniciado el protocolo de IATF y ecografías post servicio en los días 30, 60, 120, 180 y 240 post inseminación.

6.2.3.1. Ecografías pre-servicio

El objetivo de las ecografías previas al servicio al día 0 (de inyección de la GnRH) como el día 7 (inyección de la PGF) fue evaluar el estatus ovárico. Los dos ovarios fueron escaneados para observar y poder tomar registro de las estructuras ováricas presentes a través del conteo total de folículos antrales (≥ 2 mm) promedio entre ambos días, el diámetro del mayor folículo al día 7 y presencia o no del CL.

6.2.3.2. Ecografías post-servicio

Al día 30 post inseminación artificial se realizó diagnóstico de gestación mediante ecografía modo B juntamente con una serie de evaluaciones del tracto reproductivo aquí descritas. En primer lugar, se realizó ecografía Modo B para observar la presencia del embrión y luego en el ovario se observó el diámetro del CL y luego el flujo sanguíneo de forma subjetiva del mismo mediante ecografía modo Doppler por la metodología previamente descrita (De Tarso et al., 2017). También se midió el diámetro del endometrio uterino promedio con tres medidas de la misma imagen y el diámetro de la arteria uterina según metodología previamente descrita (Bollwein et al., 2000).

A los 60, 120, 180 y 240 días de gestación, además de las medidas realizadas a los 30 días de gestación en modo B y Doppler color, también fue registrado medidas del diámetro promedio de los placentomas (n = 6) en modo B (Adeyinka et al., 2014) y respectiva irrigación sanguínea en modo Doppler color a través de evaluación subjetiva del flujo sanguíneo).

6.2.4. Análisis hormonal de P4

Muestras de suero sanguíneo colectadas en los días 30, 60, 120 y 180 de gestación fueron utilizadas para determinación de los niveles séricos de P4. Dichas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal en la Facultad de Veterinaria de Montevideo, determinadas por análisis de radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida a través de kit comercial (Cat# 07270102; MP Biomedicals, Solon, OH, USA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0.025 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (0.28 ng/ml), el control 2 (5.04 ng/ml) fueron 12% y 10% respectivamente.

6.2.5. Índices reproductivos

Se evaluaron los siguientes índices reproductivos en las vaquillonas según Cavestany (1993):

a) Porcentaje de concepción al primer servicio:

$$\% \text{ Concepción} = (\text{preñadas} / \text{servidas}) * 100$$

b) Tasa de re-concepción:

Son aquellas vaquillonas con diagnóstico como preñadas y luego presentan pérdidas y vuelven a preñar durante el periodo de estudio.

c) Número de servicios por concepción (SC)

Número total de servicios sobre el número total de servicios que resultaron en preñeces.

d) Repetición servicios y perdidas gestacionales

Los registros de animales que presentaron comportamiento de celo post inseminación, con el auxilio de las observaciones de comportamiento y los parches, fueron confirmados a través de ecografía para confirmación de que el animal no estaba gestante. Los intervalos entre celos (días) y la cantidad de servicios realizados por animal fue utilizado para calcular fallas reproductivas (reabsorciones y abortos) y total de servicios por concepción.

e) Porcentaje de preñez total

El porcentaje de preñez total o final fue calculado por la cantidad de vaquillonas preñadas sobre todas las vaquillonas ofrecidas o sea el total de vaquillonas del proyecto, utilizando la siguiente formula:

$$\text{Preñez} = (\text{preñadas} / \text{total}) * 100$$

6.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistix v 10.0. Los datos que presentaron una distribución normal se analizaron mediante el modelo mixto ANOVA para medidas repetidas y las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Aquellos datos que no presentaron una distribución normal, fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El test exacto de Fisher se utilizó para evaluar los parámetros respecto a datos de frecuencia, como la preñez. Los otros parámetros de frecuencia fueron sometidos al test de Chi Cuadrado. El nivel de significancia fue del 5% lo que indicaría una diferencia significativa.

7. RESULTADOS

7.1. Detección de *Leptospira* spp.

La detección mensual de leptospiruria en animales vacunados y no vacunados durante el periodo de agosto de 2018 hasta febrero de 2020 se presenta en el **Cuadro I**. Durante el período de recría de las terneras, hasta los 15 meses de edad (julio 2019), fue identificado un total de 16 animales positivos a *Leptospira* spp. (7 vacunadas y 9 no vacunadas). En 15 de esas 16 vaquillonas se logró la identificación de la especie de *Leptospira* spp., siendo: 3 positivas para *L. interrogans* a partir de muestras de orina y 12 vaquillonas positivas a la especie de *L. borgpetersenii*, de las cuales 6 fueron mediante aislamiento (5 a partir de muestras de orina y 1 a partir de muestra cervicouterina) identificando el serogrupo Sejroe, serovar Hardjo. A la vaquillona restante no se logró la identificación de la especie.

Luego, de agosto 2019 hasta febrero 2020, se diagnosticaron 23 vaquillonas positivas a *Leptospira* spp. (13 vacunadas y 10 no vacunadas) sin la identificación de especie. En todo el periodo de estudio sobre las 60 terneras inicialmente negativas (diciembre 2018 - febrero 2020) se diagnosticó así un total de 39 vaquillonas con leptospiruria, con eliminación intermitente en algunas vaquillonas (más de un episodio de leptospiruria detectada). Sin embargo, el número de vaquillonas infectadas por *Leptospira* spp. fue similar ($P > 0.05$) entre animales vacunados y no vacunados (**Cuadro I**).

Cuadro I. Detección de *Leptospira* por qPCR de la orina y muestra cérvico uterina de vaquillonas Holstein durante el periodo de desarrollo (3 – 17 meses de edad; agosto 2018 y febrero 2020) y durante período reproductivo y de gestación (15 – 22 meses de edad; octubre y diciembre 2019, enero y febrero 2020) en los animales vacunados y no vacunados contra *Leptospira*.

Mes	Período de Diagnóstico														
	Ago 2018 [†]	Nov 2018	Dic 2018 [†]	Ene 2019	Feb 2019	Mar 2019	May 2019	Jun 2019	Jul 2019	Set 2019	Oct 2019	Nov 2019	Dic 2019	Ene 2020	Feb 2020
Edad (meses)	1-4		5-8	6-9	7-10	8-11	10-13		12-15	13-16	15-18	16-19	17-20	18-21	19-22
Vacunación		X	X					X				X			
Si	3/88		0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	5/30 (16.7%)	0/30 (0%)		2/29 (6.9%)	7/29 (24.1%)	3/29 (10.3%)	9/29 (31.0%)	4/29 (13.7%)	3/29 (10.3%)	1/29 (3.4%)
No	(3.4%) [‡]		1/30 (1.7%)	2/30 (6.7%)	2/30 (6.7%)	5/30 (16.7%)	1/30 (3.3%)		4/30 (13.3%)	6/30 (20.0%)	3/30 (10.0%)	7/30 (23.3%)	1/30 (3.3%)	4/30 (13.3%)	0/30 (0%)

[†] Periodo previo de la primo-vacunación y momento de selección de las terneras negativas para seguir evaluación temporal. [‡]positivas / total de vacas (porcentaje de positivas). X: meses en los que se realizó la vacunación, Nov 2018: primo vacunación, Dic 2018: booster al mes, Jun 2019: revacunación a los 6 meses del primer booster y Nov 19 revacunación anual.

Como el objetivo central de este proyecto es evaluar el efecto de la infección natural de *Leptospira* spp. sobre la performance y desarrollo reproductivo, el factor vacunación no fue considerado como una variable independiente para las evaluaciones sobre los parámetros reproductivos en el presente trabajo. Si bien se realizó MAT en el suero de los animales estudiados en ambos grupos, se utilizó solamente el factor de diagnóstico de *Leptospira* por qPCR en la orina para considerar animales positivos o negativos (pues el MAT no permite diferenciar anticuerpos producidos durante una infección natural, de aquellos que se disparan por inmunización con la vacuna). El factor de vacunación como variable independiente está siendo evaluado en un trabajo separado, analizando la respuesta inmunológica de los animales y la protección contra la infección/reinfección; estos resultados están en fase de análisis y forman parte de la tesis de posgrado de Federico García en el marco de un proyecto liderado por el laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur + INIA, UMPI.

Cabe destacar que los animales no presentaron síntomas de enfermedad durante todo el período de estudio. Una vaquillona con diagnóstico negativo a *Leptospira* spp. tuvo baja ganancia diaria y desarrollo corporal por lo que debió ser descartada del estudio previo al servicio reproductivo.

7.2. Pubertad: detección del primer-estro y frecuencia de celos

Para evaluar el efecto de la infección de *Leptospira* spp. sobre la edad de la pubertad de las vaquillonas, fueron consideradas aquellas con diagnóstico positivo (n=10) y negativo (n=49) a *Leptospira* spp. anterior a la detección del primer estro (evaluado desde los 3 hasta los 14 meses de edad de cada vaquillona). Con un promedio general de 9.6 ± 0.24 meses, la edad al primer estro fue similar ($P > 0.05$) entre los animales positivos y negativos (**Figura 1**). Independientemente del factor de infección, se observó gran variabilidad de la cantidad e intervalos de detecciones de celo entre los animales (**Figura 2**).

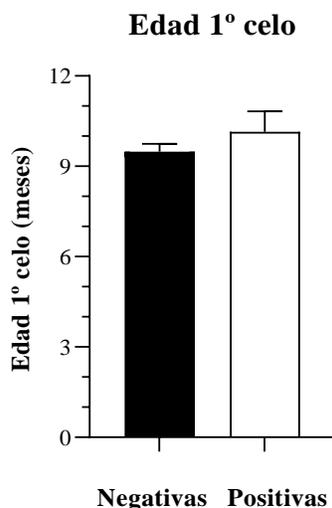


Figura 1. Edad al primer celo en los grupos de terneras con diagnóstico positivo y negativo para *Leptospira* spp. $P > 0.05$ entre los animales positivos y negativos.

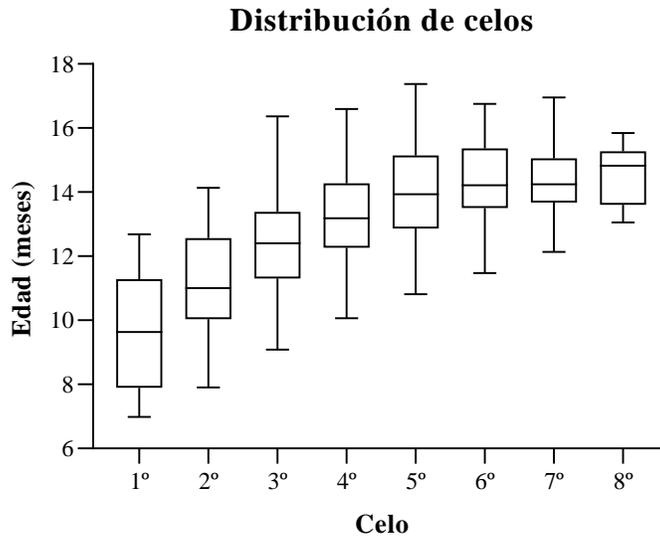


Figura 2. Distribución de la detección de celos de las terneras entre 6 y 16 meses de edad.

7.3. Características de la población folicular y diámetro del folículo preovulatorio al momento de la primera inseminación

Para evaluar el efecto de la infección de *Leptospira* spp. sobre la población de folículos antrales y diámetro del folículo preovulatorio de las vaquillonas al momento de la primera inseminación, se consideró aquellas con diagnóstico de infección positiva (n=26) y negativa (n=33) por qPCR en la orina hasta el primer servicio reproductivo a los 14 meses (junio 2019 - octubre 2019). Todas las vaquillonas que recibieron el protocolo de sincronización estaban ciclando (presencia de cuerpo lúteo). El conteo total de folículos antrales promedio entre los días 0 y 7 del protocolo de IATF (19.8 ± 1.17) y el diámetro del folículo dominante al día 7 (11.9 ± 0.47) fue similar ($P > 0.05$) entre animales positivos y negativos para *Leptospira* spp. (**Figura 3 y 4, respectivamente**).

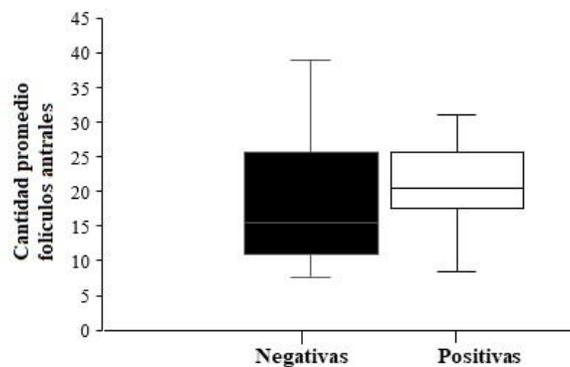


Figura 3. Cantidad promedio de folículos entre los días 0 y 7 de la IATF para animales positivos y negativos. $P > 0.05$ entre animales positivos y negativos.

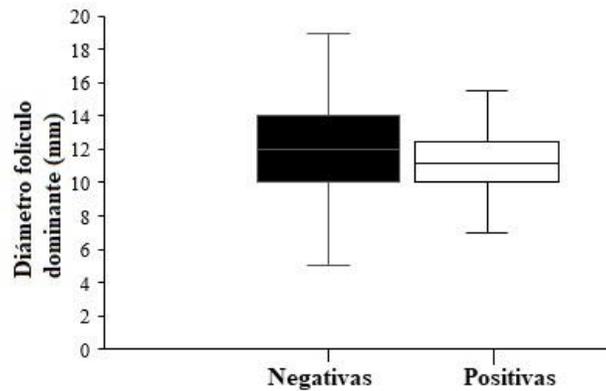


Figura 4. Diámetro (mm) folículo dominante al día 7 de iniciado el protocolo de IATF de las vaquillonas tanto positivas como negativas en su primer servicio reproductivo. $P > 0.05$ entre animales positivos y negativos.

7.4. Servicios reproductivos y pérdidas gestacionales

Para evaluar el efecto de la infección de *Leptospira* spp. sobre el porcentaje de concepción al primer servicio, se consideró aquellas con diagnóstico positivo (n=26) y negativo (n=33) por qPCR en la orina hasta el primer servicio reproductivo a los 14 meses (julio 2019- octubre 2019). El porcentaje de concepción al primer servicio no tuvo diferencias ($P > 0.05$) en las vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp. (**Cuadro II**).

Cuadro II. Tasa de concepción al primer servicio en vaquillonas positivas y negativas hasta el comienzo del servicio reproductivo (julio-octubre 2019).

	Positivas	Negativas	Total
% concepción al 1 ^{er} servicio (P/S)	26.9 (7/26)	21.2 (7/33)	24 (14/59)

$P > 0.05$ entre animales positivos y negativos.

Para evaluar el efecto de la infección de *Leptospira* spp. sobre el número total de inseminaciones, la tasa de reconcepción, las pérdidas reproductivas, el porcentaje de preñez final y los parámetros evaluados durante la gestación de las vaquillonas, se consideró aquellas con diagnóstico positivo (n=39) y negativo (n=20) por qPCR en la orina durante todo el periodo de estudio (diciembre 2018-febrero 2020).

El promedio total de inseminaciones fue de 2.1 ± 0.12 , sin diferencia ($P > 0.05$) entre vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp.

La tasa de re-concepción, fue similar ($P > 0.05$) entre positivas (65%) y negativas (79%) para *Leptospira* spp.

El porcentaje de preñez final fue similar ($P > 0.05$) entre vaquillonas positivas (72%) y negativas (85%) del proyecto (**Figura 5**).

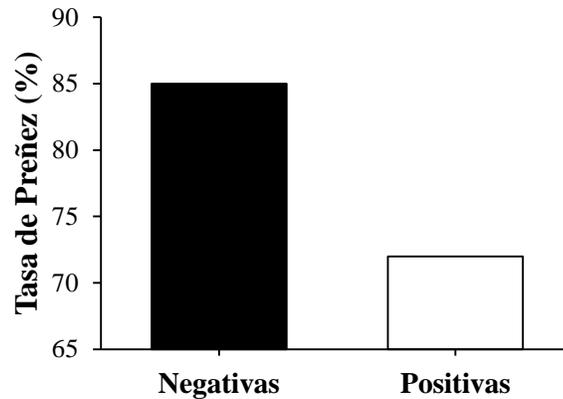


Figura 5. Porcentaje de preñez total final en vaquillonas del estudio. $P = 0.3$ entre animales positivos y negativos.

En lo que respecta a las pérdidas reproductivas totales, las vaquillonas positivas presentaron mayor ($P < 0.05$) cantidad de pérdidas que las negativas (**Figura 6**), con una probabilidad 5.7 mayor (I.C. 95%: 1.7 - 19.4) a presentar pérdidas gestacionales en aquellas vacas con diagnóstico positivo a *Leptospira* spp. comparadas con negativas. Las pérdidas fueron evaluadas en distintos períodos (**Figura 7**); no se observaron diferencias significativas entre animales positivos y negativos ($P > 0.05$) para el período < 30 días, entre 61-90 días y $>$ de 90 días. Sin embargo, al evaluar el periodo entre 31 y 60 días, ($P < 0.05$) la cantidad de pérdidas reproductivas en los animales infectados por *Leptospira* spp. fue mayor a la observada en los animales no infectados.

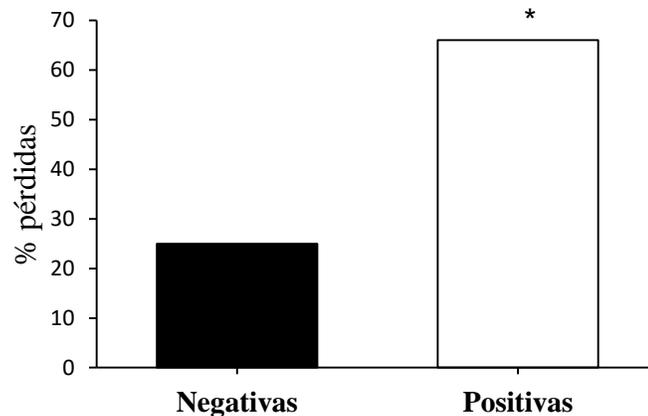


Figura 6. Pérdidas reproductivas totales entre vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp. *Los valores difieren ($P = 0.005$) entre vaquillonas positivas y negativas con pérdidas reproductivas.

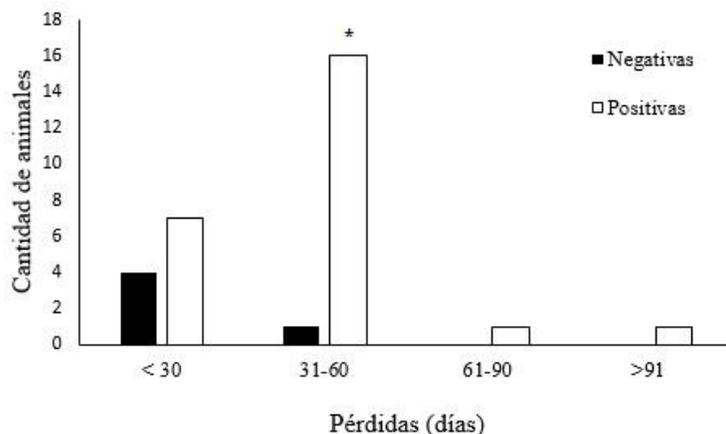


Figura 7. Pérdidas reproductivas durante distintos días de gestación, menor a 30 días, entre 31-60 días, entre 61-90 días y más de 90 días. * Los valores difieren ($P < 0.05$) entre vaquillonas que tuvieron pérdidas positivas y negativas para el intervalo 31-60 días.

7.5. Espesor del endometrio y diámetro de la arteria uterina

El espesor del endometrio uterino promedio de las vaquillonas durante los días de evaluación (30-240 días) fue de 2.64 ± 0.11 mm, siendo similar ($P > 0.05$) entre el grupo de positivas y negativas para *Leptospira* spp, en los distintos días de gestación. Sin embargo, independientemente de los grupos, hubo un aumento ($P < 0.05$) en el espesor del endometrio de 0.4 mm entre 30 y 120 días y luego, entre 180 y 240 días de gestación, se observó una reducción ($P < 0.05$) de 0.55 mm (**Figura 8**).

El diámetro promedio de la arteria uterina fue de 14.74 ± 0.5 mm para los distintos días de evaluación, sin diferencias ($P > 0.05$) entre los grupos. Sin embargo, independientemente de los grupos, se detectó un mayor diámetro ($P < 0.05$) para el día 240 respecto al día 30, 60 y 120, normalizándose al día 180 (**Figura 9**).

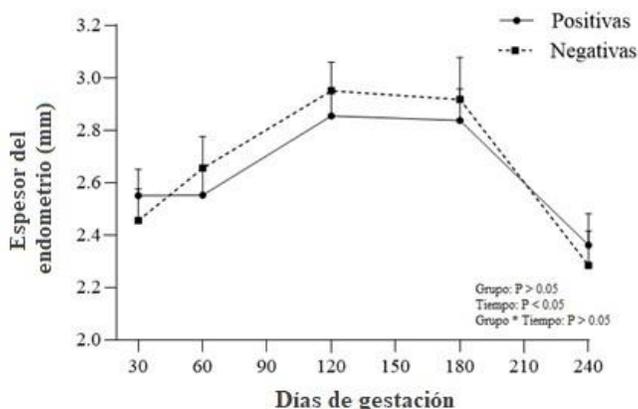


Figura 8. Espesor del endometrio uterino (mm) en los distintos días de gestación para vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp.

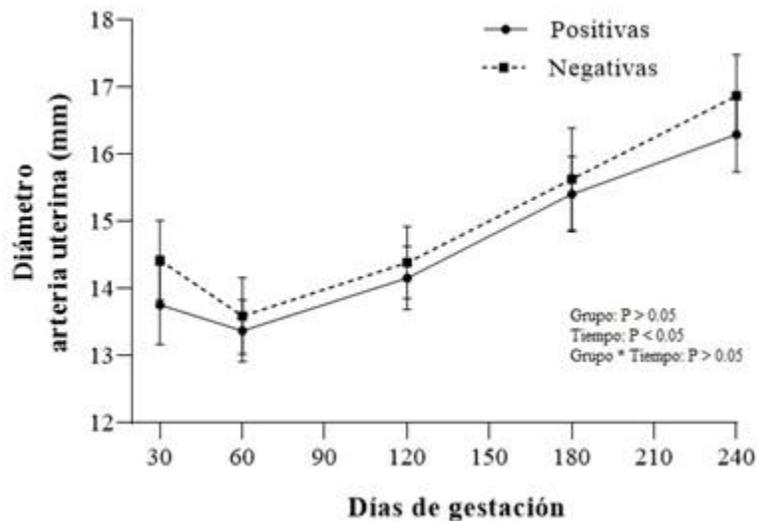


Figura 9. Diámetro de la arteria uterina en los distintos días de gestación para el grupo positivas y negativas para la infección por *Leptospira* spp.

7.6. Desarrollo de los placentomas y cuerpo lúteo

El diámetro y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo fue similar ($P > 0.05$) entre los grupos positivas y negativas para *Leptospira* spp. Al evaluar los distintos días de gestación se observó un aumento ($P < 0.05$) del diámetro de los 120 a los 180 días de gestación. En el caso del flujo sanguíneo, no se observaron diferencias entre los días ($P > 0.05$) (**Figura 10**). Por otro lado, el diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas fue similar entre los grupos infectados y no infectados por *Leptospira* spp. ($P > 0.05$), con un aumento ($P < 0.001$) tanto para el diámetro como para el flujo sanguíneo ($P < 0.05$) a medida que avanzó la gestación (**Figura 11**). Los placentomas presentan una correlación positiva ($r = 0.783$, $P < 0.001$) entre el flujo sanguíneo y el diámetro durante su desarrollo gestacional (**Figura 12**).

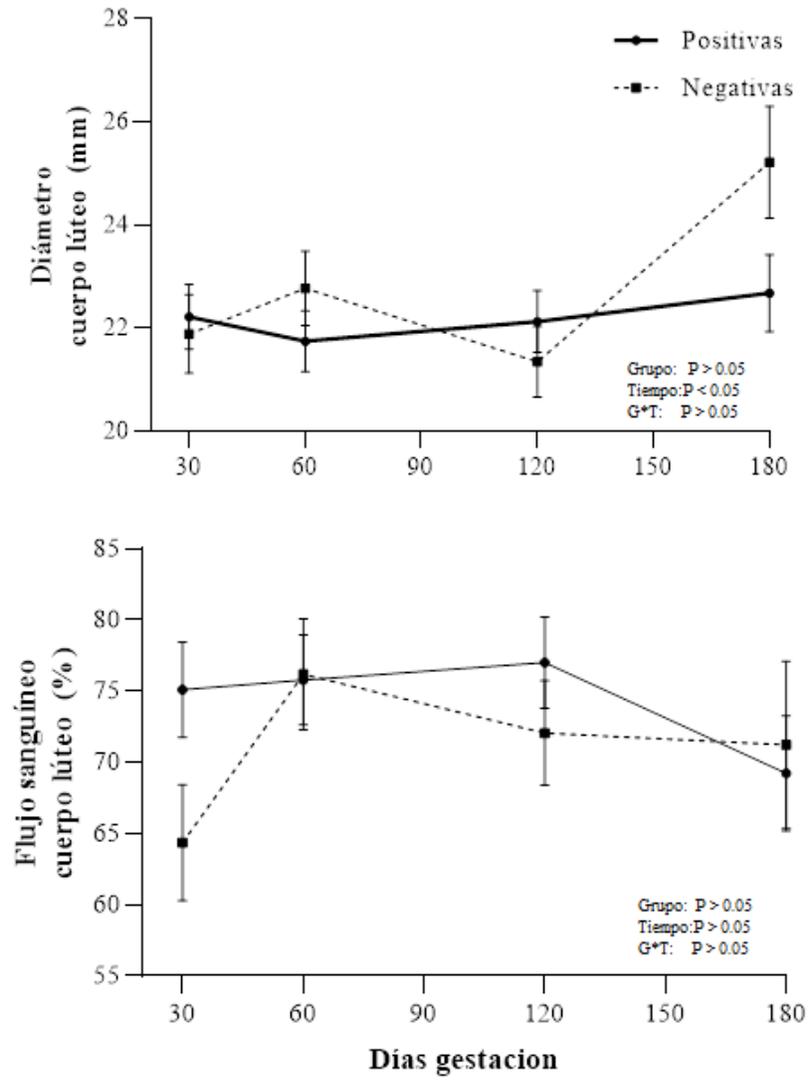


Figura 10. Diámetro y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo en los distintos días de evaluación en vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp.

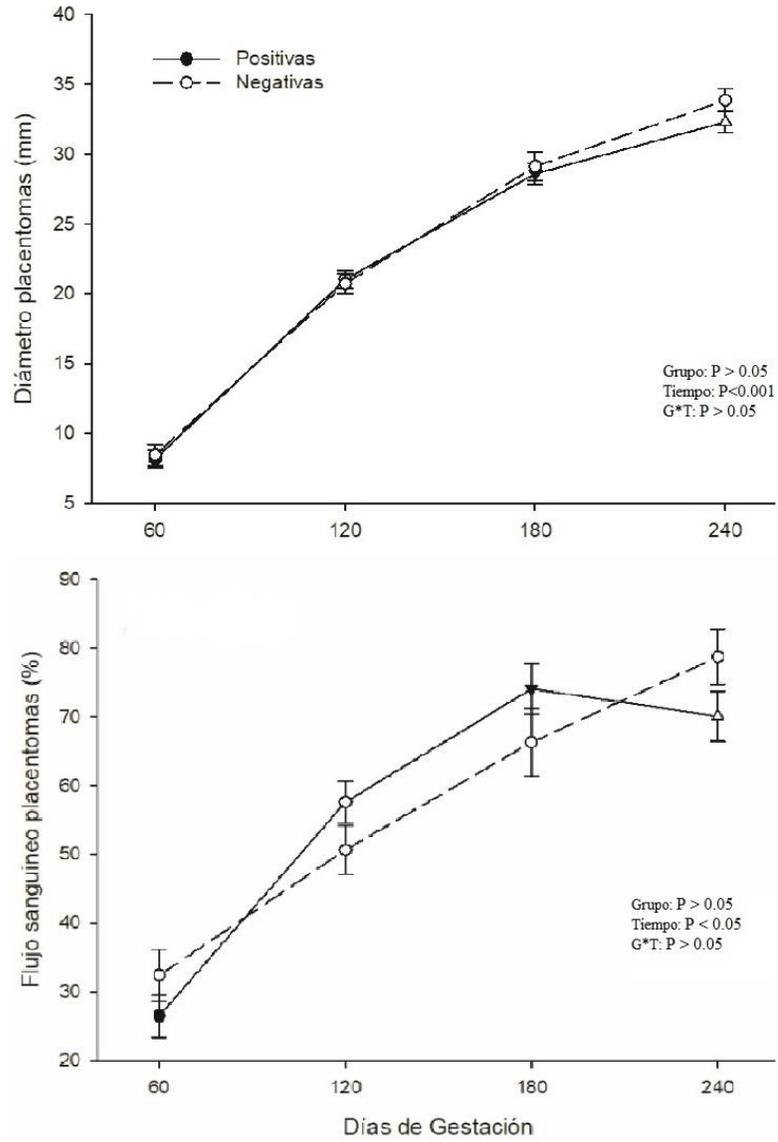


Figura 11. Diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas en los distintos días de evaluación en vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp.

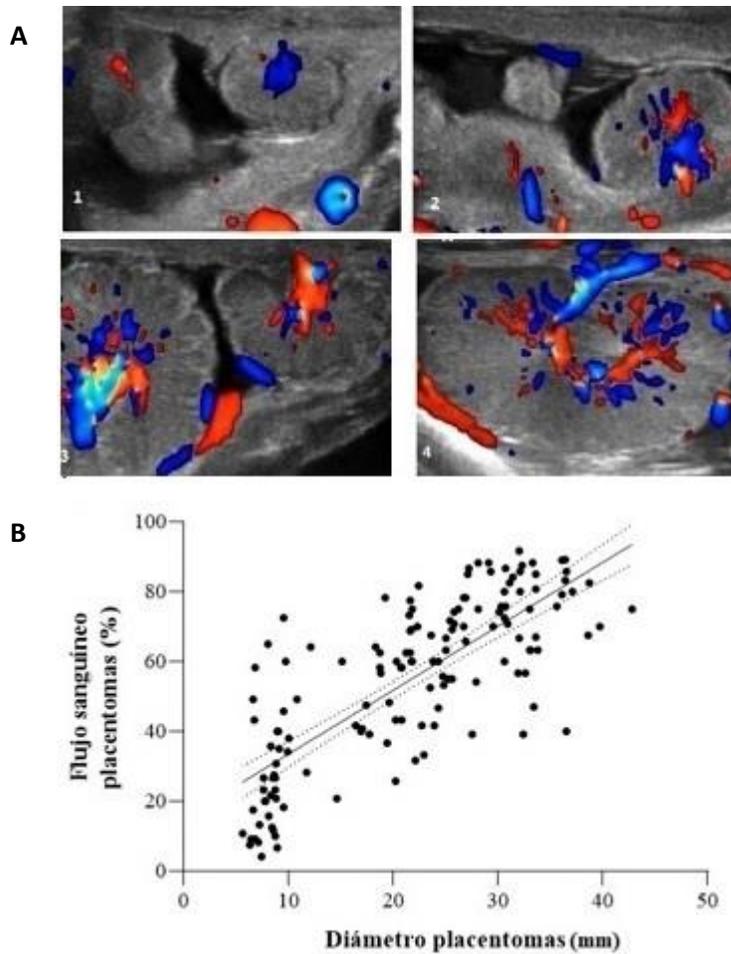


Figura 12. (A) Ilustración de los placentomas (estructuras internas en los círculos) a los días 60 (1), 120 (2), 180 (3) y 240 (4) de gestación; flujo sanguíneo (puntos coloridos internos) evaluados en las vacas a través de ecografía Doppler color. (B) Regresión lineal entre diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas. [(Doppler = 15.281 + (1.805 * Diámetro Placentoma); $r = 0.783$, $R^2 = 0.604$; $P < 0.001$].

7.7. Concentración de progesterona

Los datos de la concentración de progesterona en sangre evaluados se resumen en la **Figura 13**. No se observaron diferencias significativas para los grupos de positivas y negativas para la infección por *Leptospira* spp. Independientemente del grupo positivas o negativas a *Leptospira* spp., al evaluar los distintos días de gestación, se observó una mayor concentración de P4 al día 30 respecto a los días 120 y 180. Por otro lado, el día 60 también presentó mayor concentración de P4 respecto al día 120.

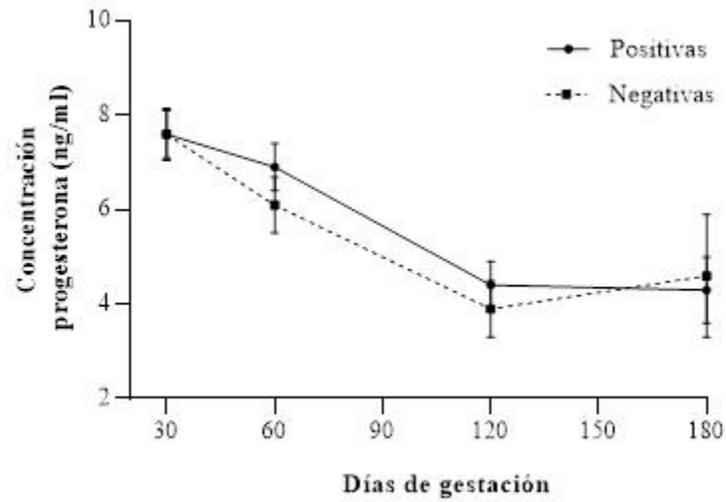


Figura 13. Concentración de progesterona entre los distintos días de evaluación para el grupo de vaquillonas positivas y negativas para *Leptospira* spp.

8. DISCUSION

8.1. Principales hallazgos de este estudio

El presente estudio es original al haber evaluado el potencial de infección natural de *Leptospira* spp. en bovinos, y muy en especial el posible efecto de dicha infección en el desarrollo fisiológico reproductivo de estos animales de producción. Para ello se monitorearon mensualmente 60 terneras Holstein desde los 3 meses hasta los 24 meses de edad (culminando con la parición), en un escenario de exposición e infección natural por bacterias del género *Leptospira*. Es así como se pudieron comparar una serie de parámetros relevantes entre animales infectados y no infectados, y en las diferentes fases productivas (recría, estación reproductiva y período gestacional).

La evaluación mensual permitió estudiar la dinámica de la infección, colonización renal y excreción mediante la detección de *Leptospira* spp. en muestras de orina de las terneras a los 3 meses de edad, observándose para la mayoría de los animales infectados una eliminación intermitente de leptospirosis en orina durante el período de estudio. Respecto a la fisiología reproductiva, observamos mayor frecuencia de estros irregulares, repetición de celos y pérdidas embrionarias y fetales tempranas en vaquillonas positivas a *Leptospira* spp. Además, a nuestro mejor saber y entender, los datos cuantitativos recabados son los primeros a ser reportados en cuanto al diámetro endometrial, y al diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas durante toda la gestación en vaquillonas Holstein positivas y negativas para *Leptospira* spp.

8.2. Periodo de desarrollo inicial de la recría: 3-14 meses de edad

En el presente estudio, del total de las terneras evaluadas hasta el primer servicio reproductivo, el 44% presentaron una positividad individual a *Leptospira* spp. Este resultado está por encima a lo que mencionan estudios anteriores en el Uruguay por Zarantonelli et al. (2018) con una positividad individual del 20% y Repiso et al. (2005) con una seropositividad del 25-50%. Sin embargo, los resultados de los estudios mencionados no consideran solamente el período recría de las terneras; siendo informaciones de todas las categorías presentes en el rodeo y con un único diagnóstico. Si la positividad es evaluada durante todo el período del presente estudio (diciembre 2018-febrero 2020) observamos una positividad individual a *Leptospira* spp. del 65%, presentando valores por arriba de los registros de los trabajos antes mencionados. Cabe destacar que en el presente estudio la eliminación de *Leptospira* spp. por orina ocurrió de forma intermitente durante el período evaluado en algunas vaquillonas. Conforme a lo previamente descrito (Ellis, 2015), la característica de eliminación intermitente dificulta la búsqueda del agente bacteriano o su ADN en orina, aun en animales cursando la infección. Por lo tanto, estos resultados demuestran que hay animales que pueden estar infectados, no presentar síntomas de la enfermedad y eliminar la bacteria en un determinado momento de su vida.

Un hallazgo interesante fue la leptospirosis en vaquillonas desde los primeros meses de vida; a pesar de que la patogenia de las enfermedades reproductivas es poco conocida, algunos autores creen que la forma más frecuente de contagio es por contacto directo madre-ternera post parto (Alonso-Andicoberry et al., 2001b) o también por contacto directo con animales adultos que presenten leptospirosis, como sucede en el presente trabajo donde previo inicio del estudio, se

diagnosticaron animales adultos con leptospirosis pudiendo ser una fuente de contagio para los terneros recién nacidos (Hamond et al., 2014). No se descarta la posible transmisión horizontal indirecta con infección vía ambiental por contacto de agua contaminada con orina de animales infectados previamente descrita por Hamond et al. (2014), pero tiene un rol más importante en las infecciones accidentales (Ellis, 1994). Por lo tanto, en regiones endémicas de la enfermedad, el diagnóstico y monitoreo temprano de animales con leptospirosis puede permitir el control previo a la etapa de servicios para evitar futuras pérdidas reproductivas y reducir la diseminación de *Leptospira* spp. entre los animales.

Las especies *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*, identificadas en los animales positivos del presente estudio, son las especies más frecuentemente aisladas en bovinos en Uruguay (Zarantonelli et al. (2018), y descritas en la literatura como capaces de colonizar y persistir en el tracto genital de vacas infectadas (Ellis, 2015). En la especie *L. borgpetersenii* aislada en el presente estudio se identificó el serogrupo Sejroe, serovar Hardjo. Este serogrupo ha sido recientemente reportado como causante principal de la leptospirosis genital bovina (Loureiro et al., 2017). Esta información se relaciona con los resultados de fallas reproductivas detectados en el presente estudio, lo que se discute más abajo.

Por otro lado, al registrar la edad de la pubertad previo al comienzo de servicios reproductivos en vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp. no se observaron diferencias entre los grupos. A pesar de que no hay información en la literatura que asocie la infección por leptospirosis con la edad a la pubertad, no es sorprendente encontrar que los animales tarden o que no lleguen a su edad productiva afectando entonces su llegada a la pubertad (Wathes et al., 2014) por diferentes causas que afectan el desarrollo de las terneras.

8.3. Período de servicios reproductivos (14-16 meses de edad)

Hasta ahora no se ha encontrado información sólida acerca de cómo *Leptospira* spp. puede afectar la concepción al primer servicio. Es de notar que en vaquillonas positivas a *Leptospira* spp. se observó similar porcentaje de concepción comparada con vaquillonas negativas, pero luego al momento de mantener la gestación es donde se producen las pérdidas estadísticamente significativas.

8.3.1. Características de la población folicular y diámetro del folículo preovulatorio al momento de la primera inseminación

No se ha encontrado información en literatura respecto al diámetro y contaje total de folículos previa inseminación en vaquillonas contrastando animales positivos y negativos a *Leptospira* spp. En lo que respecta al diámetro de los folículos presentes en el ovario, no se observaron diferencias entre vaquillonas infectadas o no infectadas en el presente trabajo. No se ha encontrado información en literatura respecto al diámetro y contaje total de folículos previa inseminación en vaquillonas contrastando animales positivos y negativos a *Leptospira* spp. pero sí hallazgos de Gindri et al. (2019) que se reporta una disminución del diámetro folicular correlacionado con la presencia de LPS intrafolicular, en definitiva retrasando y disminuyendo el tiempo de ovulación, con menor número de vacas ovuladas. En ovinos, Battaglia et al. (2000) describe que los LPS impactan negativamente

en la frecuencia y el comportamiento estral. La estructura de membrana externa de la *Leptospira* spp. es similar a la de las bacterias Gram negativas cuya membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) y que en el género *Leptospira* constituye el principal antígeno de superficie (Cameron, 2015). La endotoxemia es una consecuencia, entre otros factores, de la infección por bacterias productoras de LPS y que los mismos generan un impacto negativo sobre la folículoogénesis, el comienzo de la pubertad, el comportamiento estral, la ovulación, la función luteal y la esteroideogénesis ovárica (Bidne et al., 2018). Sin embargo, se sabe que las sutiles diferencias en la estructura de las regiones conservadas del núcleo del LPS en *Leptospira* correlacionan con una marcada reducción en su endotoxicidad en el modelo murino (Chignard et al., 2005). Estas informaciones invitan a profundizar en los estudios vinculados al LPS, por ejemplo, utilizando cepas mutantes que no expresan esta molécula en superficie, para corroborar las observaciones de gran variabilidad de cantidad e intervalos de detecciones de celo entre los animales del presente estudio.

8.3.2. Pérdidas reproductivas tempranas

Las vaquillonas con diagnóstico positivo para *Leptospira* spp. tuvieron un 40% más de pérdidas gestacionales tempranas diagnosticadas por la repetición de estros irregulares (>24 días) y ecografía. Estos resultados están en línea con lo que menciona Aymée et al. (2021), donde se reporta que el principal problema reproductivo obtenido en su estudio fue la repetición de estros a causa de la mortalidad embrionaria temprana que ocurre gracias a la inflamación en respuesta a la colonización leptospiral, que altera la implantación; y/o por daño embrionario directo por este patógeno (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Conforme lo descrito en la literatura (Arashiro et al., 2017), los desórdenes reproductivos en bovinos se distribuyen en ~ 76% por repetición de estro y muerte embrionaria tardía, y ~ 15% por abortos. Esto es coherente con las observaciones del presente trabajo en relación a las pérdidas totales, considerando el porcentaje de repeticiones de celos, reabsorciones y abortos. Del total de vaquillonas con repeticiones de estro en el presente trabajo, el 78% fue positivo a *Leptospira* spp.; tal como mencionan Libonati et al. (2018), Loureiro & Lilenbaum (2020) y Pimenta et al. (2019), las vaquillonas con repetición de estros y subfertilidad son las principales causas de la muerte embrionaria temprana por leptospirosis genital bovina caracterizada por ser una enfermedad silente y crónica. Por otro lado, vaquillonas diagnosticadas como negativas a *Leptospira* spp. y que presentaron pérdidas tempranas, igualmente pueden estar relacionadas a dicha infección y no haber sido diagnosticadas; tal como fue descrito por Rocha et al. (2017), pueden existir animales infectados con excreción intermitente de leptospirosis sugiriendo la presencia de otras vacas positivas a *Leptospira* spp. que no se detectaron durante el tiempo de muestreo. No se descartan pérdidas reproductivas causadas por otras etiologías que no se diagnosticaron en el presente trabajo, incluyendo otros agentes infecciosos, factores hormonales, genéticos/hereditarios, exposición a agentes farmacológicos, tóxicos, ambientales y/o nutricionales (Grimard et al., 2006; Anderson, 2007; Clothier & Anderson, 2016; Briano et al., 2019). Dentro de las de origen infeccioso se encuentran: *Neospora caninum*, *Campylobacter fetus*, *Brucella abortus*, virus de la diarrea viral bovina (vDVB) y herpesvirus bovino-1 (HVB-1), *Trichomona foetus* así como también está descrito el aborto a causa de *Coxiella burnetii* en el país de forma reciente

(Macias-Rioseco, 2018). Es importante destacar que las pérdidas gestacionales (embrionarias y fetales tempranas) se asocian con importantes pérdidas económicas por descartes y fallas reproductivas (Lee & Kim, 2007).

8.4. *Período gestacional (15-24 meses edad)*

Un bajo número de abortos (n=6) entre los 45 y 260 días de gestación fue observado en el presente estudio con un 66.7% de animales positivos y un 33.3% de animales negativos a *Leptospira* spp, esto, puede asociarse, lo que atribuimos principalmente al serogrupo Sejroe actuante en el predio. Según Muniz Oliveira et al. (2021), los eventos de abortos están más comúnmente asociados con los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Pomona que los abortos en este último serogrupo se dan en forma de brotes con hasta un 30% de pérdidas en el último tercio de la gestación (Ellis 2015). Por otro lado, las especies identificadas del serogrupo Sejroe provocan principalmente mortalidad embrionaria.

Interesantemente, del total de vaquillonas que abortaron, tres de ellas lo hicieron al mes siguiente de ser diagnosticadas como infectadas por *Leptospira* spp.; lo que puede relacionarse con el aborto que ocurre durante una fase aguda en el comienzo de la infección leptospiral y luego la infección se hace crónica y silente, caracterizado principalmente por mortalidad embrionaria y consecuente subfertilidad (Aymée et al., 2021). Estos resultados coinciden también con lo que menciona Ellis (2015), en cuanto a que la infección crónica y silente es una forma frecuente de presentación de la Leptospirosis y es asociada a la pérdidas reproductivas. A pesar de que el diagnóstico del aborto bovino es complejo y, en muchos casos no se logra identificar el agente causal (Macias-Rioseco, 2018), hubiera sido de gran utilidad poder obtener los fetos de las vaquillonas abortadas del presente trabajo para poder realizar un correcto diagnóstico. En el Uruguay, estudios recientes mencionan que la Neosporosis es la causa más frecuente de aborto, sugiriendo investigar más acerca de los mecanismos de patogénesis, epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis para determinar la importancia de esta enfermedad como causa de aborto en Uruguay (Macias-Rioseco, 2018).

8.4.1. *Diámetro del endometrio y de la arteria uterina*

La hipótesis de que las vaquillonas positivas, como respuesta inflamatoria a la infección, pudiesen presentar mayor diámetro endometrial fue refutada en el presente trabajo. El diámetro del endometrio durante la gestación fue similar entre vaquillonas positivas y negativas a *Leptospira* spp. Un trabajo anterior experimental en perras, observó que las leptospiras pueden dañar al endometrio incitando a una respuesta inflamatoria y una expresión anormal de proteínas, que en definitiva pueden llevar a la interrupción del desarrollo embrionario y causar fallas reproductivas (Wang et al., 2014). Por otro lado, Loureiro & Lilenbaum (2020) sugieren que en bovinos la inflamación uterina en respuesta a la colonización por *Leptospira*, puede provocar fallas en la implantación y daño directo del embrión desencadenando la mortalidad embrionaria; aun cuando se desconoce el mecanismo exacto de patogenicidad inducida por leptospirosis provocando insuficiencia reproductiva. Además, Molinari et al. (2021), recientemente demostraron que *Leptospira* spp. elude su detección por las células epiteliales del endometrio (minimizando así la

inducción de respuesta inflamatoria que las células endometriales bovinas son normalmente capaces de disparar frente a componentes bacterianos), o bien que desencadena una respuesta inmune no clásica. Por lo que sugieren que *Leptospira* spp serovar Hardjo no induce una respuesta inflamatoria clásica en las células del epitelio endometrial de bovinos (Molinari et al., 2021). Esta información podría ser la razón por la cual no se observaron diferencias entre el diámetro endometrial de vaquillonas infectadas y no infectadas por *Leptospira* spp. en el presente trabajo.

El crecimiento y remodelación de la vasculatura uterina durante la gestación son necesarios para facilitar el aumento esencial del flujo sanguíneo útero-placentario (Cipolla & Osol, 1994). Al evaluar el diámetro de la arteria uterina en el presente trabajo, no se observaron diferencias entre las vaquillonas infectadas y no infectadas por *Leptospira* spp. Respecto a los días de gestación, hubo una tendencia a aumentar el diámetro desde el día 30 al 240 de gestación, observándose el mayor diámetro en el periodo final de gestación; similar a los hallazgos de Cipolla & Osol (1994), que describen crecimiento en diámetro de casi dos veces de las arterias uterinas durante la gestación, además volviéndose menos rígidas.

8.4.2. Desarrollo de los placentomas y cuerpo lúteo

Al evaluar el diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de infectadas y no infectadas a *Leptospira* spp. En la medida que avanzó la gestación, hubo una correlación positiva entre el aumento del diámetro con el flujo sanguíneo de los placentomas; similares resultados fueron observados en búfalos a partir del segundo mes hasta el final de la gestación (Gaur and Purohit, 2020). Posterior a una infección sistémica por *Leptospira* spp., las bacterias pueden localizarse directamente en la placenta o la trompa uterina, ocasionando placentitis crónica, fibrosis cotiledonaria, anemia y consecuentemente la emaciación fetal (Guzman, 2017). Adler & De la Peña Moctezuma (2010) y Becerra & Veloza (2014) describen que animales infectados por *Leptospira* spp. presentan en sus cotiledones, una coloración marrón clara y áreas intercotiledonarias amarillentas y edematosas, debido a la placentitis y posterior daño vascular de los cotiledones, con posterior muerte del feto. Dicha placentitis puede ocurrir en cualquier momento de la gestación, asociándose con infiltración por neutrófilos y necrosis en vellosidades del corion o por presencia de material eosinofílico en el corión, necrosis de las vellosidades, hiperplasia adenomatosa e infiltración de células mononucleares (Ruiz et al., 2018). Hubiera sido de gran interés obtener las placentas de aquellas vaquillonas positivas a *Leptospira* spp. para evaluar la presencia de las características previamente mencionadas. Sin embargo, no fue posible la detección inmediata y recolección del material para dichas evaluaciones. Cabe destacar que el presente trabajo presenta un seguimiento mensual de la gestación para el diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas, parámetros cruciales para el avance del conocimiento sobre la patogenia de diferentes enfermedades que afectan la gestación.

En cuanto al diámetro y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo, se observó que la infección por *Leptospira* spp. no tuvo efecto significativo sobre dichos parámetros. Una observación peculiar fue el aumento del diámetro del cuerpo lúteo en el día 180 respecto al día 120, no encontrando en la literatura trabajos que reporten un cambio similar en dicho período. Por otro lado, la irrigación

sanguínea se mantuvo de manera constante durante la gestación; lo que indica la presencia del cuerpo lúteo activo (Matsui & Miyamoto, 2009). Cabe destacar que la evaluación del flujo sanguíneo del CL mediante Doppler color puede ser de gran utilidad para estimar la función relacionada con la producción de progesterona, además de poder realizar un diagnóstico temprano de pérdida fetal.

8.4.3. Concentración de progesterona

En el presente trabajo, las concentraciones de progesterona promedio durante toda la gestación fue de 5.66 ng/ml. Sin embargo, al evaluar las concentraciones de P4 en los diferentes días se observó que; la concentración de progesterona no tuvo diferencias entre los días 30 y 60 pero se observó una disminución en los días 120 y 180 de gestación. Cuanto a los valores promedios durante la gestación, esto fue similar a lo descrito por Ginther et al. (1974) donde las concentraciones de progesterona en sangre de vacas preñadas presentó un promedio de 5.3ng/ml durante toda la gestación. Cuanto a las variaciones entre los días de gestación, los resultados al comienzo y en la mitad de la gestación fueron similares a lo demostrado por Donaldson et al. (1970) donde menciona que existe un aumento de P4 al comienzo de la gestación con posterior concentración constantes o leve disminución entre los días 100-170 de gestación, aumentando nuevamente en el día 220. No está bien definido el motivo por el cual las concentraciones de progesterona disminuyen en esos días de gestación, pero se especula que animales en crecimiento tienen aumento de peso constante y a su vez el desafío de la preñez, pueden tener también su metabolismo acelerado. Este concepto está en el mismo sentido con lo que Ginther et al. (1974) describe en vacas, que las concentraciones de P4 en leche disminuyen en los días 150, 180 y 210 por el alto metabolismo.

8.5. Consideraciones finales

Este estudio permitió realizar un seguimiento controlado durante el crecimiento, el primer servicio reproductivo y durante todo el período gestacional de vaquillonas Holstein naturalmente expuestas a la infección por *Leptospira* spp. Las informaciones novedosas aquí presentadas facilitarán futuros trabajos para evaluar parámetros específicos, tanto de los efectos de diferentes especies de *Leptospira* spp. sobre la fertilidad, así como de los eventos fisiológicos reproductivos durante el período de desarrollo de las hembras bovinas. En ese sentido, el seguimiento de performance reproductiva no solo en el primer servicio y parto, sino también durante toda la vida del animal, sería de gran validez para comprender cómo afectan las especies detectadas en los primeros meses de vida, en la longevidad de la hembra en un rodeo lechero. Además, para reforzar los resultados de concepción y pérdidas embrionarias y fetales, se necesitan más estudios, en particular incluyendo un mayor número de animales para fortalecer aún más los resultados aquí presentados. Cabe destacar que el gran desafío de monitorear de forma mensual durante 24 meses un grupo de 60 vaquillonas (incluso con la llegada de la pandemia y las múltiples dificultades logísticas que implicó), fue superado con un muy enriquecedor período de aprendizaje sobre la fisiología reproductiva asociada a la fisiopatología de la leptospirosis.

9. CONCLUSIONES

- Vaquillonas naturalmente infectadas por *Leptospira* spp. presentaron un 40% más de pérdidas gestacionales tempranas que las no infectadas.
- La performance del primer ciclo reproductivo en cuanto a la pubertad y concepción al primer servicio fue similar entre vaquillonas infectadas y no infectadas por *Leptospira* spp.
- La infección natural por *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* no causó alteraciones en la fisiología reproductiva en lo que respecta a las estructuras ováricas (cantidad de folículos y diámetro del folículo dominante previa primer inseminación, diámetro y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo durante la gestación) y uterinas (espesor del endometrio uterino) y placentarias (diámetro y flujo sanguíneo de los placentomas) durante el período de gestación.

10. REFERENCIAS

- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A., (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125, 759–767.
- Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. 66, 651-658.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72–80.
- Adeyinka, F.D., Laven, R.A., Lawrence, K.E., Van den Bosch, M., Blankenvoorde, G., Parkinson, T.J. (2014). Association between placentome size, measured using transrectal ultrasonography, and gestational age in cattle. *N. Z. Vet. J.* 62, 51–56.
- Adler, B., De la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis 140, 287–296.
- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Pereira-Bueno, J., Costas, E., Ortega-Mora, L.M. (2001a). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev. Vet. Med.* 52, 109–117.
- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Ortega-Mora, L.M. (2001b). Epidemiología , diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. (Revisión) 16, 3–10.
- Alt, D., Zuerner R., Bolin, C. (2001). Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J Am Vet Med Assoc* 219: 636-639.
- Amstalden, M., Williams, G.L. (2014). Neuroendocrine Control of Estrus and Ovulation, in: *Bovine Reproduction*. 23: 203-208
- Anderson, ML. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid-to late- gestation. *Theriogenology*. 68(3): 474-486. Arduino GDGC, Girio RJS, Magajevski FS, Pereira GT. (2009). Agglutinating antibody titers induced by commercial vaccines against bovine leptospirosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(7):575-582.
- Arashiro, E.K.N., Libonati, H., dos Santos, G.B., Nogueira, L.A.G., de Souza, G.N., Lilenbaum, W., Brandão, F.Z. (2017). Repetition of estrus is the most frequent reproductive problem after breeding in dairy cattle from Rio de Janeiro, Brazil. *Cienc. Rural* 47, 1-4
- Arent, Z., Frizzell, C., Gilmore, C., Mackie, D., Ellis, W.A. (2013). Isolation of Leptospire from genital tract of sheep. *Vet. Rec.* 173: 582.
- Aymée, L., Gregg, W.R.R., Loureiro, A.P., Di Azevedo, M.I.N., Pedrosa, J. de S., Melo, J. dos S.L. de, Carvalho-Costa, F.A., de Souza, G.N., Lilenbaum, W. (2021). Bovine Genital Leptospirosis and reproductive disorders of live subfertile cows under field conditions. *Vet. Microbiol.* 261, 1–4.
- Bartolomé, J. (2009). Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. *Taurus*,

Bs. As 11, 20–28.

- Battaglia, D.F., Krasa, H.B., Padmanabhan, V., Viguie, C., Karsch, F.J. (2000). Endocrine Alterations That Underlie Endotoxin-Induced Disruption of the Follicular Phase in Ewes 153, 45–53.
- Becerra, R., Veloza, L.C. (2014). Leptospirosis bovina como causa de enfermedad reproductiva. *Rev Sist Prod Agroecol* 5:2, 97–125.
- Benschop, J., Collins-Emerson, J., Maskill, A., O'Connor, P., Tunbridge, M., Yupiana, Y., Weston, J., (2017). Leptospirosis in three workers on a dairy farm with unvaccinated cattle. *N. Z. Med. J.*130, 102-108
- Bidne, K., Dickson, M.J., Ross, J.W., Baumgard, L.H., Keating, A.F. (2018). Disruption of female reproductive function by endotoxins 155, 169–181.
- Bielanski, A., Surujballi, O. (1996). Association of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis with bovine ova and embryos produced by in vitro fertilization 46, 45–55.
- Bielanski, A., Surujballi, O., Golsteyn, T., Tanaka, E. (1998). Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjobovis. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 65–73.
- Bielanski, A.B., Surujballi, O. (1998). *Leptospira borgpetersenii* Serovar hardjo Type hardjobovis in Bovine Embryos Fertilized in vitro 62, 234–236.
- Bollwein, H., Baumgartner, U., Stolla, R. (2002). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology* 57, 2053–2061.
- Bollwein, H., Meyer, H.H.D., Maierl, J., Weber, F., Baumgartner, U., Stolla, R. (2000). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. *Theriogenology* 53, 1541–1552.
- Bourhy, P., Herrmann Storck, C., Theodose, R., Olive, C., Nicolas, M., Hochedez, P., Lamaury, I., Zinini, F., Brémont, S., Landier, A., Cassadou, S., Rosine, J., Picardeau, M. (2013). Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–10.
- Briano C, Romero A, Sica AB, Federici MT, Rizza MD, Llambí S, Giannitti F, Caffarena RD, Schild CO, Casaux ML, Quintela FD. (2019). Mutaciones letales y semiletalas en terneros Holando de Uruguay. *Anales de las XLVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay*, pp. 114-117
- Byerley, D.J., Staigmiller, R.B., Berardinelli, J.G., Short, R.E. (1987). Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65, 645–650.
- Caffarena, R. (1971). Avances en Leptospirosis en el Uruguay. 9:186-194
- Cameron, C.E. (2015), Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. En Adler, B. (2015) *Leptospira and Leptospirosis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Ed. Springer, vol 387, Cap. 3,

- Campero C, Cantón G, Moore D. (2017), Causas infecciosas de aborto bovino, Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos. Ed. Hemisferio Sur 1ª ed Buenos Aires, Cap.3, pp.87-100.
- Cardoso, R., Alves, B., Prezotto, L., Thorson, J., Tedeschi, L., Keisler, D., Amstalden, M., Williams, G. (2014). Reciprocal changes in leptin and NPY during nutritional acceleration of puberty in heifers. *J. Endocrinol.* 1, 1–31.
- Cardoso, R.C., Alves, B.R.C., Williams, G.L. (2018). Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Anim. Reprod.* 15, 868–878.
- Cavestany, D. (1993). Eficiencia reproductiva en vacas lecheras. *Inst. Nac. Investig. Agropecu.* 37, 1–21.
- Chignard, M., Recherche, C. De, Antoine, S., Werts, C. (2005). Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. *J. Immunol.* 6022–6031.
- Cipolla, M., Osol, G. (1994). Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 805–811.
- Clothier K, Anderson M. (2016). Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. *Theriogenology* 15:933-938
- Colazo, M., Mapletoft, R.J. (2014). Fisiología del ciclo estral bovino. *Fisiol. del ciclo estral Bov.* 16, 31–46.
- Cutaia, L.E., Bo, G.A. (2007). Uso de la tecnología de la IATF en rodeos lecheros. *Sitio Argentino Produccion Anim.* 1–14.
- Davis Rincker, L.E., VandeHaar, M.J., Wolf, C.A., Liesman, J.S., Chapin, L.T., Weber Nielsen, M.S. (2011). Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *J. Dairy Sci.* 94, 3554–3567.
- De Tarso, S.G.S., Gastal, G.D.A., Bashir, S.T., Gastal, M.O., Apgar, G.A., Gastal, E.L. (2017). Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 448–457.
- Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Dobson, H., Montgomery, J., Ellis, W.A. (2011). Effect of vaccination against *Leptospira interrogans* serovar hardjo on milk production and fertility in dairy cattle. *Vet. Rec.* 138, 334-335
- Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Dobson, H., Montgomery, J., Ellis, W.A. (1996). Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Res. Vet. Sci.* 60, 163–167.
- Di Azevedo, M.I.N., Pires, B.C., Barbosa, L.F.C., Carvalho-Costa, F.A., Lilenbaum, W. (2021).

- Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. *Vet. Rec.* 143, 1–4.
- Donaldson, L.E., Bassett, J.M., Thorburn, G.D. (1970). Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of under-nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J. Endocrinol.* 48, 599–614.
- Easton, C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas de aborto bovino en el Uruguay. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR. Montevideo, Uruguay. 1–60.
- Ellis, W. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10, 463–478.
- Ellis, W.A. (2015). Animal Leptospirosis. En Adler, B. (2015) *Leptospira and Leptospirosis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Ed. Springer, vol 387, Cap. 6, pp 99-137
- Ellis, W.A. (1984). Bovine leptospirosis in the tropics: Prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med.* 2, 411-421
- Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Neill, S.D., Bryson, D.G. (1986). Bovine leptospirosis: Experimental serovar hardjo infection. *Vet. Microbiol.* 11, 293–299.
- Ellis, W.A., Thiermann, A.B., (1986). Isolation of leptospire from the genital tracts of Iowa cows. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1694–1696.
- Erickson, B.H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25, 800–805.
- Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb. Pathog.* 107, 149–154.
- Fouts, D.E., Matthias, M.A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D.E., Bulach, D., Buschiazzo, A., Chang, Y.F., Galloway, R.L., Haake, D.A., Haft, D.H., Hartskeerl, R., Ko, A.I., Levett, P.N., Matsunaga, J., Mechaly, A.E., Monk, J.M., Nascimento, A.L.T., Nelson, K.E., Palsson, B., Peacock, S.J., Picardeau, M., Ricaldi, J.N., Thaipandungpanit, J., Wunder, E.A., Yang, X.F., Zhang, J.J., Vinetz, J.M. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–57.
- Gaur, M., Purohit, G.N. (2020). Changes in blood flow to the umbilicus, placentomes, and uterus in Surti buffaloes during complete gestation. *Pharma Innov. J.* 9, 460–466. 9
- Gindri, P., de Ávila Castro, N., Mion, B., Garziera Gasperin, B., Catarelli Pegoraro, L.M., Alveiro Alvarado Rincón, J., Diniz Vieira, A., Pradieé, J., Machado Pfeifer, L.F., Nunes Corrêa, M., Schneider, A. (2019). Intrafollicular lipopolysaccharide injection delays ovulation in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 211, 1-8

- Ginther, O., Nuti, L., Wentworth, B., Tyler, W. (1974). Progesterone concentration in Milk and Blood During Pregnancy in cows 357, 354–357.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187–200.
- Gosden, R.G., Hunter, R.H.F., Telfer, E., Torrance, C., Brown, N. (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 82, 813–825.
- Grooms, D.L. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis 66, 624–628.
- Guzman, L. (2017). Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (*Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum*) en explotaciones lecheras y de doble propósito en Ecuador.
- Grimard B, Freret S, Chevallier A, Pinto A, Ponsart C, Humblot P. (2006). Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Animal reproduction science.* 91(1-2): 31-44.
- Haake, D.A., Levett, P.N. (2015). Leptospirosis in humans. Adler, B (2015). *Leptospira and Leptospirosis.* *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* vol. 387, Cap. 5, pp. 65-98
- Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A.P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W. (2014a). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet. Res. Commun.* 38, 81–85.
- Hamond, C., Pestana, C.P., Rocha-de-souza, C.M., Cunha, L.E., Brandão, F., Medeiros, M., (2015). Presence of leptospire on genital tract of mares with reproductive problems. *Vet. Microbiol.* 7018, 1–6.
- Hamond, Camila, Pinna, A., Martins, G., Lilenbaum, W. (2014b). The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1–10.
- Healy, A.A., House, J.K., Thomson, P.C. (2013). Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 96, 1905–1914.
- Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C.A., Dalmau, E.A., Quintero, G.M. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J. Microbiol. Methods* 84, 1–7.
- Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K, Walton J, Johnson W. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1), 9–23
- Kinder, J.E., Day, M.L., Kittok, R.J. (1987). Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34, 167–186.
- Kojima, F.N. (2003). The Estrous Cycle in Cattle: Physiology, Endocrinology, and Follicular Waves. *Prof. Anim. Sci.* 19, 83–95.

- Kurykin, J. (2017). Sex-sorted semen: Efficiency of insemination and opportunities to increase outcome of pregnancies in dairy and beef cattle. a review. *Vet. ir Zootech.* 75, 22–29.
- Larson, R.L. (2007). Heifer Development: Reproduction and Nutrition. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 23, 53–68.
- Lee, J., Kim, I. (2007). Pregnancy loss in dairy cows : the contributing factors , the effects on reproductive performance and the economic impact 8, 283–288.
- Leonard, F.C., Quinn, P.J., Ellis, W.A., O’Farrell, K. (1993). Association between cessation of leptospiuria in cattle and urinary antibody levels. *Res. Vet. Sci.* 55, 195–202.
- Levett, P.N. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. Systematics of Leptospiraceae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 11–20.
- Levett, P.N. (2003). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 36, 447–452.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
- Libonati, H.A., Santos, G.B., Souza, G.N., Brandão, F.Z., Lilenbaum, W. (2018). Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 1625–1629.
- Lilenbaum, W., Martins, G. (2014). Leptospirosis in cattle: A challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 63–68.
- Loureiro, A.P., Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology* 141, 41–47.
- Loureiro, A.P., Pestana, C., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W. (2017). High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Anim. Reprod. Sci.* 178, 50–54.
- Macias-Rioseco, M. (2018). Causas de aborto en bovinos lecheros de Uruguay. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo. Uruguay
- Manthey, A.K., Anderson, J.L., Perry, G.A., Keisler, D.H. (2017). Feeding distillers dried grains in replacement of forage in limit-fed dairy heifer rations: Effects on metabolic profile and onset of puberty. *J. Dairy Sci.* 100, 2591–2602.
- Masri, S.A., Nguyen, P.T., Gale, S.P., Howard, C.J., Jung, S.C. (1997). A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. *Can. J. Vet. Res.* 61, 15–20.
- Matsui, M., Miyamoto, A. (2009). Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound : Practical use for reproductive management in the cow. *Vet. J.* 181, 232–240.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Wijayagunawardane, M.P.B., Watanabe, S., Hayashi, M., Yamamoto, D., Matsui, M., Acosta, T.J. (2005). Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 329–339.
- Molinari, P.C.C., Nally, J.E., Bromfield, J.J. (2021). Bovine endometrial cells do not mount an

inflammatory response to *Leptospira* 2:3, 187–198.

- Monte, L.G., Ridieri, K.F., Jorge, S., Oliveira, N.R., Hartwig, D.D., Amaral, M.G., Hartleben, C.P., Dellagostin, O.A. (2015). Immunological and molecular characterization of *Leptospira* interrogans isolated from a bovine foetus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 40, 41–45.
- Muniz Oliveira, G.D., Nogueira Garcia, L.A., Aymée Pires Soares, L., Lilenbaum, W., Nunes de Souza, G. (2021). Leptospirosis by Sejroe strains leads to embryonic death (ED) in herds with reproductive disorders. *Theriogenology* 174, 121–123.
- Nieves, C. (2018). Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación. Tesis de Maestría. Programa de Desarrollo de Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1–29.
- OIE, (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Parasitology.
- Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: Herd and individual approaches. *Vet. Rec.* 170, 1-2.
- Pereira, M.H.C., Cooke, R.F., Alfieri, A.A., Vasconcelos, J.L.M. (2013). Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. *Anim. Reprod. Sci.* 137, 156–162.
- Peter, A.T. (2013). Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology* 80, 693–705.
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nat. Rev. Microbiol.*
- Pimenta, C.L.R.M., da Costa, D.F., Silva, M.L.C.R., Pereira, H.D., Júnior, J.P.A., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Alves, C.J., de Azevedo, S.S. (2019). Strategies of the control of an outbreak of leptospiral infection in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 237–241.
- Plunkett, A.H., Graham, T.W., D, P., Famula, T.R., D, P., Oberbauer, A.M., D, P. (2013). Effect of a monovalent vaccine against *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain hardjobovis on fertility in Holstein dairy cattle 242, 1564–1572.
- Puche, R., Ferrés, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., Iraola, G. (2018). *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.
- Repiso, M. V, Gil, A., Fernandez, L., Guarino, H., Herrera, B., 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* 40, 5–28.
- Rocha, B.R., Narduche, L., Oliveira, C.S., Martins, G., Lilenbaum, W. (2017). Demonstração molecular da intermitência eliminando *Leptospira* em vacas e ovelhas e suas implicações no controle. *Cienc. Rural* 47, 1–4.
- Ruiz, J., Perez, J., Espinosa, J.A., Valencia, A.F., Jaramillo, D.A. (2018). Placentitis bacteriana como causa de aborto en yeguas : reporte de caso. *Scielo.Org* 22, 236–247.
- Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., Barros, C.M. (2005). Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63, 2382–2394.
- Seidel, G.E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8, 160–164.
- Smith, C.R., Ketterer, P.J., McGowans, M.X., Corneyn, B.G. (1994). A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle 71, 290–294.
- Smyth, J.A., Fitzpatrick, D.A., Ellis, W.A. (1999). Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: A study of calves infected with *Leptospira*. *Vet. Rec.* 145, 539–542.
- Stevenson, JS, (2007). Clinical reproductive physiology. En: Youngquist RS, Threlfall WR Large Animal Theriogenology 2. Ed Saunders 2^a ed. St. Louis Missouri, Cap 35, 258-270.
- Sveberg, G., Refsdal, A.O., Erhard, H.W., Kommisrud, E., Aldrin, M., Tvette, I.F., Buckley, F., Waldmann, A., Ropstad, E. (2011). Behavior of lactating Holstein-Friesian cows during spontaneous cycles of estrus. *J. Dairy Sci.* 94, 1289–1301.
- Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 88, 359–363.
- Vincent, A.T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V.K., Bernet, E., Al, E. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 1-25
- Wang, W., Gao, X., Guo, M., Zhang, W., Song, X., Wang, T., Zhang, Z., Jiang, H., Cao, Y., Zhang, N. (2014). *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs. *Microb. Pathog.* 75, 1–6.
- Wathes, D.C., Pollott, G.E., Johnson, K.F., Richardson, H., Cooke, J.S. (2014). Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 8, 91–104.
- Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da, C., Silveira, S., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Mortola, A., Mene, C., Hamond, C., Macı, M., Picardeau, M., Quintero, J., Rı, C., Varela, G., Rivero, R., Schelotto, F., Riet-correa, F., Buschiazzi, A. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity , and uncovers a relevant risk for human leptospirosis 1–22.