

AVANCES EN LA EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN URUGUAY

Dr. Alejandro Buschiazzo y Dra. Alejandra Suanes.

MGAP-DILAVE: Dra. Alejandra Suanes, Dra. Ximena Salaberry, Dr. Rodolfo Rivero, Dr. Fernando Dutra, Dra. Florencia Buroni, Dra. Carolina Briano, Dra. Cristina Easton, Br. Natalia Barrandeguy, Br. Gimena Avila. IPM: Dr. Alejandro Buschiazzo, Dra. Leticia Zarantonelli, Lic. Cecilia Nieves, INIA: Dr. Federico Giannitti, Dra. Caroline Da Silva Silveira, Dra. Melissa Macias Rioseco, Dr. Franklin Riet Correa, Dr. Martin Fraga. IH-UdelaR: Dr. Felipe Schelotto, Dr. Gustavo Varela, Lic. Paulina Meny, Dra. Cristina Rios, Lic. Clara Menéndez, Lic. Jair Quintero, Dra. Natalia Ashfield.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira*. Es una enfermedad zoonótica, probablemente la más extendida en cuanto a distribución mundial (Costa, F y col, 2015), infectando al hombre y a la mayoría de los mamíferos domésticos y animales salvajes (Faine, S y col, 1999; Le Febvre, R y col, 1987). El curso clínico de la enfermedad puede ser agudo, subagudo o crónico.

En bovinos, la infección aguda de terneros causa septicemia y alta mortalidad, en vacas mastitis y agalactia. La infección crónica causa disminución de la eficiencia reproductiva del rebaño, causando abortos, nacimiento de terneros débiles así como, mayor número de servicios por preñez y aumento del intervalo entre partos (Adler B, y col 2010).

Hasta el momento el género *Leptospira* incluye 22 especies diferentes, entre las cuales hay 7 saprófitas de vida libre, 5 patógenas intermedias y 10 patógenas (Fouts, D y col, 2016). Otro sistema de clasificación, separa a las cepas de *Leptospira* en serovares, o variantes serológicas, de las que a la fecha hay más de 300 diferentes en distintas regiones del mundo. Dichos serovares se pueden agrupar a su vez en serogrupos, en base a reactividad con anticuerpos de referencia (reflejando similitudes antigénicas). Ambos sistemas de clasificación, basados en genética o en antigenicidad, coexisten y no son siempre simples de congeniar, pues un mismo serovar puede pertenecer a diferentes especies de *Leptospira* (Faine, S y col 1999).

La clasificación fenotípica/antigénica sigue usándose, sobre todo en aplicaciones veterinarias, pues la protección vacunal no cruza entre distintos serovares (Adler B, 2015), y

además se sabe que ciertos serovares están adaptados a huéspedes específicos. Esta característica determina una condición de portadores de la enfermedad a los huéspedes de mantenimiento, perpetuando la enfermedad en la población (Faine S y col 1999).

En infecciones bovinas endémicas por el serovar Hardjo, es común tener 30-40% de los animales de un rebaño infectados, y eliminando bacterias en su orina. Hay abortos, mortinatos o nacimiento de terneros débiles, pero en general éstos se ven cuando una vaca está infectada por primera vez. Los abortos pueden ocurrir semanas después de la infección. Pueden nacer terneros infectados, pero aparentemente sanos. Los abortos causados por la infección por Hardjo tienden a ocurrir esporádicamente en oposición a las "tormentas" de aborto que pueden ocurrir como resultado de la infección con los serovares Pomona o Grippotyphosa (Bolin C, 2003).

Las alternativas del diagnóstico de laboratorio para la leptospirosis son: examen directo de muestras sospechosas en microscopio de campo oscuro; cultivo de leptospirosis a partir de muestras clínicas; detección de anticuerpos en pruebas serológicas y detección de ADN de leptospirosis por técnicas de biología molecular (Faine y col., 1999, Bharti y col., 2003). Las pruebas disponibles tienen diferentes características, dependiendo del tipo de tejido disponible, el curso de la enfermedad y el propósito de la prueba (Jouglard y col., 2006). Un gran número de técnicas serológicas son usadas para el diagnóstico de leptospirosis, cada una con sensibilidad y especificidad propias (Postic y col, 2000). El inmunoensayo enzimático (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT, del inglés **M**icroscopic **A**gglutination **T**est) son los métodos de laboratorio más utilizados.

La MAT, desarrollada por Martin & Petit (1918), sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico serológico de leptospirosis, tanto para humanos como para animales (Postic y col, 2000; Subharat y col., 2011; Picardeau M., 2013). La MAT cuantifica anticuerpos contra *Leptospira* en el suero sanguíneo, donde la unidad de estudio es el serovar. Tiene la desventaja de trabajar con microorganismos vivos, esto hace que los laboratorios tengan que contar con un nivel de bioseguridad adecuado, además de ser una técnica laboriosa ya que hay que mantener un cepario de leptospirosis vivas como banco de referencia de variantes antigénicas. El MAT detecta anticuerpos aglutinantes IgM e IgG. En algunos casos no diferencia anticuerpos vacunales de los provocados por una infección. Los títulos de anticuerpos inducidos por vacunación en ganado, registraron desde valores indetectables hasta 1/3000 aproximadamente, ensayados por MAT (Marshall y col., 1979; Hodges y Day 1987). Dicha respuesta serológica cae dentro de los 3 meses post-vacunación, en algunos casos pudiendo persistir hasta seis meses (Marshall y col., 1979, Hodges y Day, 1987). Estos datos son muy importantes, a la hora de hacer la interpretación del informe de MAT. Otra característica de esta técnica es la pobre correlación entre estado serológico de un animal y su estado portador (Ellis y col., 1981), con reportes de aislamiento de leptospirosis a partir de portadores seronegativos por cultivo de orina o riñón (Ellis y col., 1981). Dada la reacción cruzada limitada o nula entre distintos serovares, para que la serología por MAT sea adecuada, deben usarse serogrupos y serovares representativos en la región o país, para constituir el banco de cepas de referencia (Lilenbaum y col, 2014). Los primeros estudios serológicos reportados en el Uruguay fueron hechos por el Dr. Leaniz y datan de 1959. Los primeros estudios de seroprevalencia en ganado bovino son reportados poco después, resultando en valores de 20-24% (Caffarena y col, 1965; Cachione y col, 1965). En estudios algo más recientes el Dr. Gil y col (2001) reportan 14% de seroprevalencia en ganado lechero, y Repiso y col (2002) estiman 38,5% en ganado de carne. En el año 2003 Gil y col realizan un nuevo monitoreo en la cuenca lechera sur del Uruguay (San José, Colonia y Florida) encontrando que las seroprevalencias variaban según área geográfica de 11-50%. En fin, Easton M (2006) estudia causas de abortos bovinos, encontrando que en 197 de los 431 fetos estudiados (45,7%) la etiología era bacteriana, y que el 62,4% (123/197) eran seropositivos a *Leptospira*.

La División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) cuenta con un servicio de leptospirosis. La técnica de diagnóstico utilizada es la MAT, reconocida por OIE (Organización Mundial de Salud Animal) como prueba de referencia. En Uruguay se estableció para bovinos un título de corte de 1/200. En base a la información serológica, los serovares de mayor reactividad en la población bovina en Uruguay son: Hardjo (con sus 2 biotipos, Hardjo-Bovis y Hardjo-Prajitno), Wolffii y Pomona. Existen variaciones interanuales de seroprevalencias, debidos a influencia climática y estacional de la enfermedad (Suanes, 2013).

En nuestro país la leptospirosis humana es una enfermedad de notificación obligatoria que debe realizarse frente a la sospecha de la enfermedad aún no confirmada por laboratorio. Las notificaciones se realizan al Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública. Un 70% de personas enfermas corresponde a trabajadores vinculados a la actividad rural y/o en contacto con ganado bovino. Según grupo etario, se observó principalmente en adultos jóvenes entre 20 y 39 años, potencialmente activos. Schelotto F y col reportaron en 2012 una incidencia promedio entre los años 2000 a 2010 de 3,6/100.000 habitantes lo que, teniendo en cuenta la subnotificación, resulta en una incidencia proyectada de 15/100.000 habitantes. El Depto. de Epidemiología del MSP informó una incidencia de 4,2/100.000 habitantes en 2015, y 3 pacientes murieron por la enfermedad.

En el año 2014 el Ministerio de Ganadería a través de la Dirección de laboratorios Veterinarios (DILAVE), junto con el Instituto Pasteur de Montevideo (IPM), comenzaron a trabajar con el objetivo de aislar leptospirosis patógenas de bovinos infectados. Dicha interacción permitió lanzar un primer proyecto Innova-gro, aún en curso denominado: "Tipificación y diagnóstico de *Leptospira* spp. por técnicas moleculares: hacia el diseño de vacunas recombinantes". Además del aislamiento de cepas locales de *Leptospira*, el desafío era lograr tipificarlas con aproximaciones tanto serológicas como moleculares, lo que ha sido conseguido con éxito. En el año 2015 el gran interés nacional en el tema hizo que se formara un grupo interinstitucional y multidisciplinario constituido por: IPM, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Universidad de la República (UdelaR, a través del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina) y DILAVE. Los laboratorios

privados de producción de vacunas nacionales (Microsules, Prondil y Virbac-Santa Elena) se integraron para colaborar en el proyecto ANII modalidad Alianza (vinculación sector público-privado) "**Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira spp.* aisladas de casos de leptospirosis bovina en Uruguay**". El objetivo principal de este proyecto es el aislamiento y tipificación de 60 cepas de leptospirosis patógenas para crear y mantener un primer banco de cepas nacional de *Leptospira spp.*, fortaleciendo asimismo las capacidades tecnológicas nacionales para el abordaje de la leptospirosis bovina. Dicho cepario será valioso para informar sobre serovares relevantes para formular vacunas eficaces. Es así que durante estos últimos 2 años este grupo multicéntrico ha venido aportando capacidades complementarias desde cada Institución, desarrollando tareas que van desde la obtención de muestras a partir de ganado bovino, hasta el aislamiento microbiológico de cepas de las bacterias patógenas y el análisis detallado de su identidad por técnicas moleculares.

METODOLOGÍA

Para lograr el objetivo se plantearon 3 escenarios de muestreo:

1- Muestreo de animales a campo con títulos altos de anticuerpos contra leptospirosis, con antecedentes de abortos y/o enfermedad aguda. Se consideraron también como focos a ser estudiados los casos con antecedentes de abortos en los cuales los veterinarios de campo ya hubieran enviado sangre para titulación de anticuerpos y se encuentren títulos altos anti-leptospira. Se visitaron los establecimientos para colectar muestras de orina para cultivo y muestras de sangre para serología. También se incluyeron muestreos a campo de terneros con signos clínicos y/o lesiones (ictericia y/o hemoglobinuria) que hicieran sospechar la enfermedad. Se tomaron muestras de terneros vivos (orina, y sangre con y sin anticoagulante) y muertos (órganos).

2- Muestras de fetos o terneros muertos durante o posterior al parto: Estas muestras son enviadas al Laboratorio por parte de los veterinarios de campo. Para su procesamiento se siguió el protocolo ya establecido por la DILAVE e INIA plataforma Salud Animal. Se procesaron órganos: riñón, hígado, líquido abomasal, humor acuoso y bazo, así como líquido de cavidad y suero de la madre para

analizar por test serológico (MAT).

3- Muestreos en plantas de faena: Se visitaron plantas de faena en todo el país y se extrajeron al azar muestras de riñón de diferentes tropas cada día. Se recogió orina por punción vesical. Los riñones fueron transportados al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, refrigerados, para procesamiento y análisis.

Las actividades de muestreo a campo fueron coordinadas y ejecutadas entre la red de Laboratorios de la DILAVE (Laboratorios Regionales de Montevideo, Paysandú y Treinta y Tres) y los profesionales veterinarios de libre ejercicio. Los muestreos en plantas de faena fueron coordinados por el IH-UdelaR en acuerdo con los servicios de inspección veterinaria MGAP en cada planta.

Los rebaños muestreados, fueron previamente detectados como focos por parte de la DILAVE Central (Laboratorio de Leptospirosis), por presentar: animales con títulos $\geq 1/200$ por MAT y/o antecedentes de abortos o síntomas de enfermedad aguda. Los sueros muestreados fueron procesados por MAT usando el cepario de referencia con 7 serovares: Pomona, Hardjo, (biotipo Hardjo-Prajitno y Hardjo-Bovis), Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa y Canicola. Se consideran positivos aquellos sueros con títulos iguales o superiores a $1/200$.

En la visita a los predios, se tomaron muestras de sangre y orina de 19 animales (con y sin antecedentes de abortos). Las muestras de orina fueron procesadas para aislamiento en la DILAVE e IH. Cada muestra de orina fue sembrada en medio selectivo EMJH con 5-fluorouracilo (5-FU), luego incubando a 29°C por hasta 6 meses. Los cultivos fueron observados al microscopio de campo oscuro (40X) cada 1-2 semanas. El equipo del IPM en forma paralela procesó las mismas muestras de orina para detectar el gen *lipL32* (gen marcador de especies patógenas de *Leptospira*) por la técnica de PCR a tiempo final, lo cual es útil para priorizar el seguimiento de cultivos positivos. Las muestras de tejidos de terneros y fetos se procesaron de acuerdo a protocolos previamente establecidos, los órganos (bazo, riñón, humor acuoso, hígado y líquido abomasal) fueron sembrados en medio EMJH 5-FU. La PCR de *lipL32* también fue útil para re-confirmar cultivos con crecimiento de microorganismos sospechosos. Los cultivos positivos fueron purificados en la DILAVE

central y en el IH-UdelaR por filtración con filtros de 0,2µm, hasta obtención de cepas aisladas. Los aislamientos se conservan congelados en nitrógeno líquido en presencia de 2,5% DMSO, y una alícuota es enviada al IPM para su tipificación final: la determinación de especie se efectúa a partir de la amplificación parcial del gen *rARN-16S* y su secuenciación. También se amplifica y secuencia el gen *secY* agregando información sobre secuencias. La determinación de serogrupo se realiza por MAT utilizando anticuerpos de referencia (obtenidos en el instituto KIT, Holanda). Por último, esta información de especie y serovar se complementa con el resultado del análisis de loci de número variable de repeticiones en tándem (VNTR por sus siglas en inglés multilocus *variable number of tandem repeats*), tabulados que permiten la clasificación de serovar. Adicionalmente, en el IPM se están secuenciando los genomas completos de todos estos primeros aislados, usando métodos de secuenciación masiva de próxima generación.

RESULTADOS

Muestreos a campo

Se realizaron hasta ahora (marzo 2017) 41 muestreos, en 37 focos diferentes detectados en DILAVE. De los 37 focos, 3 (8,1%) fueron por sospecha de leptospirosis aguda (2 en terneros y 1 en animales adultos). El resto de focos, 91,8% (34/37) fueron identificados a partir de casos de abortos. La tabla 1 muestra la distribución de muestras de orina provenientes de dichos focos a lo largo del período de estudio (dic 2014-mar 2017). En la tabla 2 se puede observar la distribución de focos por departamento. Este muestreo dirigido (predios con alta probabilidad de tener la enfermedad), al cabo de 2 años calendario, logró cubrir una extensa superficie del país, 13 de los 19 departamentos, y comprendiendo sistemas productivos de carne y leche (Tabla 3).

Tabla 1. Total de muestras de orinas muestreadas por año

Año	Frecuencia	Porcentaje
2014	19	2.54
2015	363	48.46
2016	330	44.06
2017	37	4.94
Total	749	100.00

Tabla 2. Distribución de focos por Departamento

Departamento	Frecuencia	Porcentaje
Artigas	2	5.41
Canelones	5	13.51
Cerro Largo	1	2.70
Colonia	1	2.70
Durazno	1	2.70
Florida	6	16.22
Lavalleja	2	5.41
Paysandú	3	8.11
Río Negro	4	10.81
Salto	2	5.41
San José	2	5.41
Soriano	3	8.11
Treinta y Tres	5	13.51
Total	37	100.00

Tabla 3. Distribución de focos por sistema productivo

Sistema	Frecuencia	Porcentaje
Carnicero	20	54.05
Lechero	17	45.95
Total	37	100.00

La breve encuesta realizada en la visita a los predios durante el muestreo permitió recabar datos sanitarios, en particular antecedentes de vacunación en los últimos 12 meses (Tablas 4 y 5), sugiriendo que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.13$) en vacunación entre los predios cárnicos o lecheros estudiados.

Tabla 4. Frecuencia de focos según estatus de vacunación

Vacunación	Frecuencia	Porcentaje
No Vacunados	12	40.00
Vacunados	18	60.00
Total	30	100.00

Tabla 5. Estado de vacunación de los focos según sistema productivo.

Sistema	Vacunación		Total
	No	Si	
Carne	8	8	16
%	50.00	50.00	100.00
Lechero	4	10	14
%	28.57	71.43	100.00
Total	12	18	30
%	40.00	60.00	100.00

Pearson $\chi^2 = 2.28$ Pr = 0.13

El 17,3% del total de orinas analizadas (111/641) fueron positivas por PCR detectando el gen lipL32 (Tabla 7), indicando que dichos animales estaban infectados con leptospiras patógenas. Si se lleva este análisis al nivel de establecimientos muestreados, en el 80.65% (25/31) de los mismos al menos 1 animal presentaba leptospiras patógenas en su orina (Tabla 8), mientras que el 19.35% (6/31) resultó negativo. La Tabla 9 muestra que, una vez más, los porcentajes de predios positivos cuando se compara su sistema productivo son similares.

Tabla 7. Resultado de PCR lipL32 en muestras de orina a nivel de animales.

PCR orina	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	530	82.68
Positivo	111	17.32
Total	641	100.00

Tabla 8. Resultado de PCR lipL32 en muestras de orina a nivel de focos.

PCR Rebaño	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	6	19.35
Positivo	25	80.65
Total	31	100.00

Tabla 9. Proporción de los focos según su sistema productivo vs el resultado de PCRLipL32.

Sistema	PCR Rebaño		Total
	Negativo	Positivo	
Carne	3	15	18
%	16.67	83.33	100
Lechero	3	10	13
%	23.08	76.92	100
Total	6	25	31
	19.35	80.65	100

Integrando la información de vacunación previa, la Tabla 10 muestra que el 100% (12/12) de los rebaños que no habían recibido vacunación en los últimos 12 meses presentaban al menos 1 animal excretor de leptospiras patógenas. En cambio, de los rebaños que habían recibido al menos una dosis de vacuna sólo el 29.41% (5/17) fueron negativos. Es importante destacar que el restante 70.59% (12/17) de predios con antecedente de vacunación, presentaban de cualquier modo animales en los que se detectó infección. El total de rebaños con antecedentes de vacunación fueron 18 (Tabla 4), sin embargo las muestras de orinas de uno de ellos no fue analizada por PCR.

Tabla 10. Proporción de los focos según su estatus de vacunación vs su resultado de PCR.

Vacunación	PCR		Rebaño	Total
	Negativo	Positivo		
No Vacunados	0	12	12	12
	0.00	100.00		100.00
Vacunados	5	12	17	17
	29.41	70.59		100.00
Total	5	24	29	29
	17.24	82.76		100.00

Las muestras de orina fueron sembradas en medio de cultivo selectivo, en procura de obtener aislamientos de leptospiras. La tasa de aislamientos de leptospiras patógenas general en muestras de orina fue de un 4.49% (31/691), con una cierta variación comparando ambos años analizados (Tabla 11).

Tabla 11. Resultado de cultivos positivos en muestras de orina en el periodo 2015-2016.

Año	Cultivos		Total
	Negativos	Positivos	
2015	343	24	367
%	93.46	6.54	100.00
2016	317	7	324
%	97.84	2.16	100.00
Total	660	31	691
	95.51	4.49	100.00

El 33.33% (12/36) de los rebaños muestreados fue positivo por cultivo con al menos 1 aislamiento de leptospirosis patógenas obtenido en el periodo de estudio. Sólo en uno de los 12 focos confirmados por cultivo, la técnica de PCR *lipL32* no detectó ADN de *Leptospira* en ninguna de las orinas estudiadas para ese foco. A su vez, 13 focos que fueron confirmados con al menos una orina positiva por PCR, resultaron ser negativos para el cultivo de *Leptospira* spp. La combinación de PCR y cultivo bacteriológico demuestra ser útil maximizando las chances de detección y aislamiento del agente patógeno. Se lograron purificar 19 cultivos de leptospirosis patógenas a partir de muestras de orina, lo que representa una tasa de éxito del 61.2% en relación al total de 31 cultivos positivos obtenidos hasta la fecha.

Tabla 12. Resultado de cultivos positivos en muestras de orina a nivel de focos.

Cultivo	Frecuencia	Porcentaje
Rebaño		
Negativo	24	66.67
Positivo	12	33.33
Total	36	100.00

Se obtuvieron 19 cultivos puros de leptospirosis patógenas en muestras de orina a campo (ver detalles más abajo en la Tabla 18). De los animales donde se pudo conseguir un aislamiento puro (Tabla 13), sólo el 15.8% (3/19) fue positivo por MAT y no habían recibido vacunación en los últimos 12 meses. El restante 84.2% de aislamientos obtenidos incluye 7 animales seronegativos por MAT, así como 9 seropositivos pero que habían sido vacunados. Estos resultados refuerzan la importancia de obtener aislamientos ampliando nuestros bancos de referencia de antígenos. También señalan la necesidad de profundizar nuestros

esfuerzos por cuantificar la eficacia protectora de las vacunas disponibles, continuar con los estudios epidemiológicos de la enfermedad y eventualmente ensayar su mejoramiento por introducción de serovares autóctonos relevantes.

Tabla 13. Caracterización serológica y antecedentes de vacunación de los animales de los que se han obtenido aislamientos de leptospirosis patógenas.

MAT	Vacunación		Total
	No	Si	
Positivo	5	2	7
	71.43	28.57	100.00
Negativo	3	9	12
	25.00	75.00	100.00
Total	8	11	19
	42.11	57.89	100.00

MUESTREO DE FETOS

En el periodo de estudio se procesaron 594 muestras de órganos, obtenidos a partir de 147 fetos (Tabla 14) recibidos en DILAVE (Montevideo, Paysandú y Treinta y Tres) e INIA (Plataforma de Salud Animal, estación La Estanzuela), donde se realizó la necropsia, extracción de muestras y sembrado para cultivo bacteriológico. Los cultivos fueron estudiados durante 6 meses por microscopía de campo oscuro en la DILAVE central.

Tabla 14. Fetos recibidos en los laboratorios DILAVE e INIA por año.

Año	Frecuencia	Porcentaje
2015	51	34.69
2016	78	53.06
2017	18	12.24
Total	147	100.00

A fin de 2016 el IPM validó la técnica de PCR de *lipL32* en órganos, lo que permitió acelerar el procesamiento de los mismos para cultivo/aislamiento, con lo que se partió tanto de muestras congeladas como de material fresco. De un total de 110 tejidos analizados por PCR *lipL32*, 8 fueron positivos (Tabla 15), aunque no se han logrado aún cultivos positivos aislados. Estas 8 muestras positivas corresponden a 7 fetos individuales, un feto contribuyó

con 2 muestras de tejido positivos, hígado y riñón (Tabla 16). En suma, la proporción total de fetos positivos fue de 13.53% (7/51).

Tabla 15. Análisis de tejidos de fetos por PCR *lipL32*.

Muestra	PCR LipL32		Total
	Negativo	Positivo	
Bazo	1	0	1
Hígado	32	4	36
Líquido abomasal	18	1	19
Líquido pericárdico	2	0	2
Placenta	1	0	1
Riñón	48	3	51
Total	102	8	110

Tabla 16. Detalle de muestras fetales positivas a PCR (0=negativas, 1=positivas).

Muestra	IIP	LVIM	LXIVM	LXVIIIIM	XII-I	XLVIIIIP	XXIXP	Total
Hígado	0	1	1	0	1	0	1	4
Líquido Abomasal	0	0	0	0	0	1	0	1
Riñón	1	0	1	1	0	0	0	3
Total	1	1	2	1	1	1	1	8

Se realizó amplificación parcial del gen *rARN-16S* en todas las muestras que dieron amplificación positiva para el gen *lipL32*. En cuatro muestras se obtuvo una intensidad de amplificación suficiente que permitió obtener la secuenciación parcial del gen. Así se identificó la presencia de *L. interrogans* en tres muestras de hígado y en una muestra de riñón.

En cuanto a los resultados de cultivos bacteriológicos, a la fecha se logró un cultivo positivo de leptospiras patógenas a partir de una muestra de líquido abomasal, confirmado por PCR, pero no se llegó aún a cultivo puro.

MUESTREO DE TERNEROS

Se recibieron 81 muestras de tejidos de terneros en los laboratorios DILAVE central y regionales (Tabla 17).

De las muestras que ya han cumplido su tiempo máximo de cultivo (6 meses) se encontraron leptospiras patógenas en 2 muestras, de orina y de riñón. Las mismas fueron confirmadas por PCR *lipL32*, técnica que permitió identificar una tercer muestra positiva de líquido abomasal, aun cuando no se logró cultivar el agente. De estas tres muestras, el cultivo a partir de orina resultó en una cepa aislada pura (Tabla 18).

Tabla 17. Número de muestras a partir de tejidos de terneros sospechosos recibidas por DILAVE en el período 2015-2017.

Año	Frecuencia	Porcentaje
2015	34	41.98
2016	35	43.21
2017	12	14.81
Total	81	100.00

MUESTREO EN PLANTAS DE FAENA

Se estudiaron en el IH-UdelaR hasta el momento 243 muestras de riñones, tomadas en 22 plantas de faena, abarcando animales de todos los departamentos del país. De estas muestras, se separaron porciones para inmunofluorescencia, PCR, y se homogenizaron en PBS con un *Stomacher*® secciones tomadas de 2 lugares diferentes del órgano, para siembra en medios EMJH y Fletcher. Se tomaron además 247 muestras de orina vesical, de animales diferentes que los riñones, salvo excepciones.

El seguimiento de dichos cultivos bajo microscopio, con confirmación de varios sospechosos por PCR *ARNr-16S* y *lipL32*, ha permitido hasta el momento obtener 4 aislamientos puros a partir material cadavérico. Tres a partir de orinas, y uno de riñón.

TIPIFICACIÓN DE CULTIVOS PUROS

En suma se han obtenido 24 aislamientos puros de *Leptospira*, que están siendo tipificados en el IPM e IH (Tabla 18). *L. interrogans* se aisló en mayor proporción, seguida de *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*. Es importante recalcar que estas tres especies son patógenas, y no intermedias. El serogrupo y serovar de cada una de estas cepas aisladas ha sido determinado en la mayoría de los casos, y está en curso de verificación, cotejando con secuencias de los genomas completos obtenidos en el IPM.

Tabla 18. Especies de *Leptospira* por PCR y secuenciación parcial del gen *ARNr-16S* aisladas en muestras de orina y tejidos.

Muestras Especie	Aislamientos Puros				Total
	Muestreo de Faena	Muestreo de campo	Animales Muertos		
	Orina	Riñón	Orina	Orina*	
<i>L. borgpetersenii</i>	0	0	5	0	5
<i>L. interrogans</i>	2	1	11	0	14
<i>L. noguchii</i>	1	0	3	1	5
Total					24

*Orina proveniente de un ternero

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Considerando los datos recabados a nivel de predios, la técnica de MAT detectó el 76.6% de los focos de *Leptospira* donde se encontraban animales excretadores del microorganismo (PCR-positivos). No se debe excluir la posibilidad de que en los establecimientos negativos por PCR, los animales pudieran estar excretando leptospiros de modo intermitente y/o por debajo del nivel de detección de la técnica (~1000 bacterias/ml de orina). Así mismo, no es sencillo aseverar causa de aborto sólo en base a seropositividad para leptospirosis: aun cuando descartamos que los focos fueran positivos a brucelosis, las causas de aborto podrían ser otras y la serología atribuible a una infección pasada y no en curso. Los títulos por MAT en algunos los establecimientos donde no se detectaron animales eliminadores, estaban por debajo de 1/400 para los serovares estudiados.

A nivel de animales individuales, la técnica de MAT predijo a nivel de serogrupo 8 de los 11 aislamientos de *Leptospira interrogans*. Sólo para uno de los aislamientos de *L. borgpetersenii*, el animal presentó título de anticuerpos contra el serogrupo Sejroe. Esto puede deberse al hecho de que la sensibilidad de la técnica de MAT en serovares de mantenimiento como ser Hardjo (cuyo tipo Hardjo-Bovis pertenece a la especie *L. borgpetersenii*) puede llegar a ser baja (Ellis y col, 1986). Es de destacar que la técnica de MAT no pudo identificar a los aislamientos de *Leptospira noguchii*. Esto es sencillo de comprender, pues dentro del banco de antígenos de referencia utilizado rutinariamente en DILAVE, que incluye 7 serovares, no se incluyen actualmente ninguno que corresponda a los expresados por *L. noguchii*. Este hallazgo es importante, dado que *L. noguchii* es una reconocida especie patógena, en la medida de se vayan identificando nuevos serovares entre los aislamientos de leptospiros, se podrán ir agregando al cepario de referencia para

diagnóstico por MAT. Está reportado que esta práctica aumenta la sensibilidad de las técnicas serológicas (Pinto y col 2015).

El patrón serológico no predijo la proporción de animales excretadores ni el aislamiento posterior de leptospiros patógenas. Esto puede deberse a distintas causas. La liberación de leptospiros en orina es intermitente y no continua (Ellis, 2015), con lo que la búsqueda del agente bacteriano o su ADN en orina no siempre resultará exitoso aun en animales cursando la infección. Efectivamente, en los focos muestreados más de una vez se identificaron diferentes animales excretadores en los distintos muestreos, en los que sin embargo se analizaron los mismos animales individuales. Por otro lado, las técnicas usadas miden diferentes características: unas buscan la detección del agente (cultivo, PCR), mientras que la serología mide la respuesta inmune del huésped. Este hecho está directamente vinculado al punto ya planteado más arriba: en la medida que los bancos de antígenos de referencia para MAT se enriquezcan con serovares prevalentes en nuestro territorio, su sensibilidad aumentará.

El criterio de inclusión de focos definió un muestreo dirigido, lo cual es limitante para obtener datos cuantitativos de prevalencia proyectada a nivel poblacional. Debemos remarcar que el objetivo central en esta primer etapa del proyecto era maximizar la probabilidad de aislar leptospiros patógenas. Es importante insistir aquí, que al comienzo de este proyecto no se contaba con ningún banco de cepas autóctonas aisladas de ganado bovino, al menos en el dominio público; de allí la pertinencia de poner todo el esfuerzo en la puesta a punto de protocolos detallados que permitiesen ir desde el muestreo a campo, hasta el aislamiento bacteriológico y la tipificación serológica y molecular. Aun teniendo en cuenta que el muestreo en esta etapa ha sido dirigido, los focos quedaron distribuidos cubriendo gran parte del país, en particular incluyendo ganado de leche y de carne. Integrando en definitiva el conjunto de datos nuevos a partir de este proyecto en curso, con el histórico de serodiagnóstico que lleva adelante DILAVE y los estudios de seroprevalencia en Uruguay (Suanes 2013, Gil y col 2003 y 2001, Repiso 2002) parecería confirmarse el endemismo de la enfermedad en nuestros rodeos.

Resulta de interés comenzar a analizar nuestros datos en el contexto de los antecedentes

de vacunación de los establecimientos. Un hallazgo que merece ser señalado es la clara identificación de animales infectados (excretores de leptospiras patógenas) que habían sido vacunados en los últimos 12 meses. Los focos muestreados de ganado de leche mostraron una tendencia a vacunar más que los de carne, aunque la diferencia observada no es estadísticamente significativa con los números de muestras que hemos procesado hasta la fecha. Aun cuando dicha tendencia diferencial confirmara mayor vacunación en ganado lechero, se encontraron animales excretores (por PCR y cultivo bacteriológico) en focos correspondientes a ambos sistemas productivos. Si bien las vacunas no protegen con 100% de eficacia a animales susceptibles y teniendo en cuenta que es importante el plan de vacunación (cuanto más temprano se vacune en la vida productiva mejores resultados), por sobre todo, la vacuna es serovar-específica (Vallée E y col, 2017) por lo que es fundamental que la misma contenga los serovares de especies patógenas de *Leptospira* que están circulando en el país.

La tasa de aislamiento de leptospiras varió según el año en el periodo de estudio, pero se encontró dentro del intervalo de 2.16-6.59%, con un promedio de 4,5%, dentro de lo esperado para este género bacteriano fastidioso y de crecimiento lento (Faine y col 1999). En muestras más contaminadas durante la obtención de las mismas en campo, las probabilidades de poder aislar leptospiras disminuyen, y este es un punto clave a optimizar. Es evidente también que a la fecha hemos obtenido proporcionalmente pocos cultivos positivos a partir de tejidos, tanto de fetos como de terneros, comparado al éxito con muestras de orina. Consideramos que las muestras de órganos típicamente presentan un alto grado de contaminación ligada a la descomposición (autólisis) al momento de recibir las muestras para su procesamiento en laboratorio. Esto evidentemente dificulta sustancialmente los esfuerzos de aislamiento. Estamos estudiando métodos alternativos para resolver dichas dificultades operativas. La integración del trabajo de varias instituciones, con capacidades técnicas complementarias, ha hecho posible que en Uruguay se obtuvieran 24 aislamientos puros de leptospiras patógenas con alto grado de calidad. Es así que estamos cumpliendo el objetivo mayor de esta, que podemos considerar una primer etapa en el abordaje de la leptospirosis bovina: la creación de un cepario en el dominio público con aislamientos tipificados

al nivel de especie, serogrupo y serovar. En el transcurso de los primeros 2 años del proyecto, además de los primeros 24 aislamientos identificados, hay una cantidad de cultivos en curso de purificación. Para obtener estos resultados hemos debido optimizar protocolos para cada una de las etapas, y sortear dificultades que aparecieron también en cada una de las aproximaciones experimentales: el método detallado y riguroso para obtener las muestras en campo; el mejoramiento de condiciones de cultivo y de las técnicas de purificación de los mismos en vistas a la obtención de cepas aisladas; la puesta a punto de técnicas de biología molecular de *screening* rápido, que permiten priorizar los cultivos a seguir, que de otro modo se vuelven rápidamente demasiados para observar bajo microscopio; y la puesta a punto de técnicas combinadas (serológicas con anticuerpos de referencia, y moleculares), para poder tipificar sin ambigüedad las cepas aisladas. Estas cepas van a poder tener una aplicación directa tanto para mejorar el diagnóstico de la enfermedad a nivel predial e individual, como para ser utilizadas eventualmente en la formulación de vacunas nacionales eficaces en proteger nuestros rebaños y el consecuente beneficio en el control de una zoonosis de impacto en salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler B. Vaccines against leptospirosis. En "Leptospira and Leptospirosis" B. Adler (ed.), *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015, p 251-272. ISBN 978-3-662-45059-8.
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.
- Bolin Carol. (2003) Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference March 12-14, Reno, NV—158.
- Cacchione R. A.; Caffarena R. M.; Cascelli, E.; Martínez, E. y Agorio, M. (1965) Encuesta serológica de la Leptospirosis bovina en la República Oriental del Uruguay. *Bol. Inf. Min. Gan. y Agric. Montevideo-Uruguay.* Nos. 1093 y 1094. Año: XXII. Pp.6-11.
- Caffarena R.M. y Agorio M. (1965) Comprobaciones serológicas de Brucelosis, Fiebre "Q" y Leptospirosis en Bovinos del Uruguay. *Gaceta Veterinaria.* Buenos Aires- Rep. Argentina. Tomo: XXVII. 182: 377.
- Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martínez-Silveira M.S., Stein C., Abela-Ridder B., Ko A.I. Global Morbidity and

Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. (2015) *PLoS Negl Trop Dis.* **9**

• Easton M.C. (2006) Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Identificación de la acción de agentes infecciosos vinculados con el aborto bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República, Uruguay.

• Ellis W.A. (1986) The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: The Present State of Leptospirosis. Diagnosis and Control. Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp: 13–24.

• Ellis W.A., O'Brien J.J., Cassells J. (1981) Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Veterinary Record* **108**, 555-7.

Ellis W.A. (2015) Animal Leptospirosis. En: Adler B. Current Topics in Microbiology and Immunology: *Leptospira* and Leptospirosis. Vol. 387 pp: 99-137.

• Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. (1999). Melbourne, Australia, MediSci, p. 272. 6.

• Fouts D.E., Matthias M.A., Adhikarla H., Adler B., Amorim-Santos L., Berg D.E., Bulach D., Buschiazio A., Chang Y.F., Galloway R.L., Hake D.A., Haft D.H., Hartskeerl R., Ko A.I., Levett P.N., Matsunaga J., Mechaly A.E., Monk J.M., Nascimento A.L., Nelson K.E., Palsson B., Peacock S.J., Picardeau M., Ricaldi J.N., Thaipandungpanit J., Wunder EA Jr., Yang X.F., Zhang J.J., Vinetz J.M. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. (2016) *PLoS Negl Trop Dis.* **10**

• Gil A.D. (2001) Monitoreo sanitario en rodeos lecheros en Florida. En: Aspectos Sanitarios y Reproductivos en Bovinos. Seminario JICA/DILAVE Miguel C. Rubino. Treinta y Tres- Uruguay. Pp: 47-56

• Hodges R.T. (1974) Some observations on experimental *Leptospira* serotype pomona infection in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* **22**, 151-4.

• Jouglard S.D., Simionatto S., Seixas F.K., Nassi F.L. and Dellagostin O.A. (2006) Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology* **52**, 747-52

• Lilenbaum W. and Martins G. (2014) Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases.* **61** (1): 63-68.

• Marshall R.B., Broughton E.S., Hellstrom J.S. (1979) Protection of cattle against natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo using a hardjo-pomona vaccine. *New Zealand Veterinary Journal* **27**, 114-6.

Martin L., Pettit A. (1918) Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*, **42**:972-675.

• Picardeau M. (2013) Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Méd. Mal. Infect.* **43**, 1-9.

• Pinto P.S., Loureiro A.P., Penna B., Lilenbaum W. (2015) Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Tropica* **149** 163–167.

• Postic D., Merien F., Perolat P., Baranton G. (2000) Diagnostic biologique leptospirose – borrélioze de Lyme/Biological diagnosis leptospirosis- lyme borreliosis, 2nd ed. Paris, collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris, 177-186.

• Repiso M.V., Olivera M.A., Herrera B., Silva M., Guarino H., Núñez A., Osawa T., Fernández L., Bañales P., Gil A. (2002) Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. Seminario de Actualización Técnica. INIA Serie **228**:57-70

• Schelotto F., Hernández E., González S., Del Monte A., Ifrano S., Flores K., Pardo L., Parada D., Filippini M., Balseiro V., Geymonat J.P., Varela G. (2012) A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: An unresolved health problem. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **54** (2): 69-75.

• Suanes, A. (2013) Leptospirosis bovina: enfermedad, epidemiología y diagnóstico serológico. En: Publicación Académica "Leptospirosis". Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay. Pp: 18-25

• Subharat S., Wilson P.R., Heuer C. and Collins-Emerson J.M. (2011) Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **23**, 743-52.

• Vallée E., Ridler A.L., Heuer C., Collins-Emerson J.M., Benschop J, Wilson PR. (2017) Effectiveness of a commercial leptospiral vaccine on urinary shedding in naturally exposed sheep in New Zealand. *Vaccine.* **35**:1362-8.