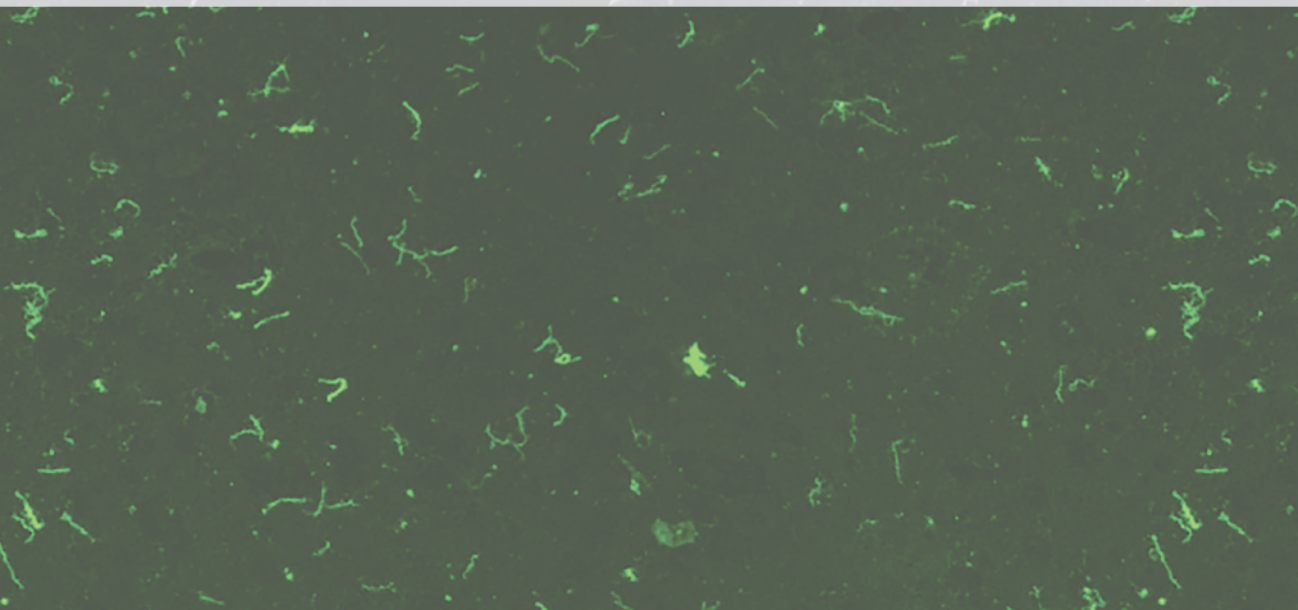


Gustavo Varela
Felipe Schelotto
coordinadores

Leptospirosis humana

Veinte años de estudio
de una enfermedad infecciosa
poco atendida



biblioteca**plural**

bibliotecaplural

Gustavo Varela y Felipe Schelotto
coordinadores

LEPTOSPIROSIS HUMANA
Veinte años de estudio
de una enfermedad infecciosa poco atendida

LEPTOSPIROSIS HUMANA

Veinte años de estudio de una enfermedad infecciosa poco atendida

Paulina Meny • Clara Menéndez • Tamara Iglesias • Jair Quintero • Cristina Ríos
Silvana Ifrán • Sabina González • Helena Katz • Juan Pablo Geymonat
Nadia Arriola • Fernando Dutra • Denise Berois • Florencia Lara • Mathias Jeldres
Marcos Leites • Alicia del Monte • Lorena Pardo • Karina Flores • Daniel Parada
Mercedes Filippini • Natalia Ashfield • Ilana Teruszkin
Camilla Nunes dos Reis Trindade • Tatiane Mendes Varela Ramos
Rodrigo Puentes • Virginia Mosca • Laureana de Brun

La publicación de este libro fue realizada con el apoyo de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República.

Los libros publicados en la presente colección han sido evaluados por académicos de reconocida trayectoria en las temáticas respectivas.

La Subcomisión de Apoyo a Publicaciones de la csic, integrada por Luis Bértola, Magdalena Coll, Mónica Lladó, Alejandra López Gómez, Vania Markarian, Sergio Martínez y Aníbal Parodi ha sido la encargada de recomendar los evaluadores para la convocatoria 2020.

Producción editorial del equipo de Ediciones Universitarias:

Equipo de Ediciones Universitarias (diseño de interior)

Andrea Duré (diagramación de interior y tapa)

Nairí Aharonián Paraskevaídís y Victoria Zabala (revisión de textos)

© Los autores, 2020

© Universidad de la República, 2023

Ediciones Universitarias,

Unidad de Comunicación de la Universidad de la República (ucur)

18 de Julio 1824 (Facultad de Derecho, subsuelo Eduardo Acevedo)

Montevideo, CP 11200, Uruguay

Tels.: (+598) 2408 5714 - (+598) 2408 2906

Telefax: (+598) 2409 7720

Correo electrónico: <ucur@udelar.edu.uy>

<<https://udelar.edu.uy/portal/institucional/comunicacion/ediciones-universitarias/>>

Fuentes de financiación:

Durante este tiempo hemos recibido apoyo económico de Fundación «Manuel Pérez»; Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República (Programa de Inclusión Social, 2014; programa Grupos I+D, 2010; programa Vinculación Universidad-Sociedad y Producción, 2018 y 2020); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (Fondo María Viñas, 2011; programa Alianza, 2014); Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

El trabajo fue distinguido con el Gran Premio Nacional de Medicina edición 2020, Academia Nacional de Medicina.

ISBN: 978-9974-0-2118-1

e-ISBN: 978-9974-0-2119-8



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Contenido

PRESENTACIÓN DE LA COLECCIÓN BIBLIOTECA PLURAL, <i>Rodrigo Arim</i>	I I
INTRODUCCIÓN	I 5
El agente	I 8
Manifestaciones clínicas en seres humanos.....	2 I
Tratamiento con antibióticos	2 2
Factores asociados con el desarrollo de síntomas severos y una evolución desfavorable.....	2 3
Enfermedad en los animales	2 3
Prevención	2 6
Conocimientos sobre leptospirosis en el personal de salud humana y animal.....	2 7
Impactos.....	2 8
Diagnóstico de laboratorio	2 8
Caracterización de los aislamientos de <i>Leptospira</i>	3 2
OBJETIVO.....	3 5
MATERIALES Y MÉTODOS	3 9
Trabajo inicial: puesta a punto de la MAT, primeros ensayos de IFI, análisis de los primeros sueros humanos y estudio local de la epidemiología de la enfermedad.....	3 9
Ensayo de la técnica de IFI-IgM de «preparación local» empleada luego en sucesivos programas de estudio.....	4 I
Evaluación de un test inmunocromatográfico comercial para la detección de anticuerpos anti- <i>Leptospira</i>	4 2
Evaluación de la PCR en tiempo real como técnica diagnóstica.....	4 2
Cultivo de <i>Leptospira</i> a partir de muestras humanas y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR: amplificación al azar de ADN polimórfico	4 3
Evaluación de otros métodos de laboratorio (macroaglutinación y ELISA) para el diagnóstico de leptospirosis humana	4 5
Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay	4 7
Caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental.....	4 8
Seroprevalencia de leptospirosis en grupos humanos en riesgo debido a factores ambientales, laborales o sociales	5 0
Reservorio vacuno	5 2
Otros componentes del reservorio animal.....	5 4

RESULTADOS.....	55
Trabajo inicial: puesta a punto de la MAT, primeros ensayos de IFI, análisis de los primeros sueros humanos y estudio local de la epidemiología de la enfermedad.....	55
Cultivo de <i>Leptospira</i> y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR: Amplificación al azar de ADN polimórfico	59
Evaluación de la macroaglutinación y ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana	63
Evaluación de otros procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infección por <i>Leptospira</i>	65
Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay	68
Primera caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental	71
Seroprevalencia de leptospirosis en grupos humanos en riesgo debido a factores ambientales, laborales o sociales	74
Bovinos y otros componentes del reservorio animal.....	80
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	83
Sobre metodología y evaluación de procedimientos de estudio.....	83
Sobre aspectos clínicos y epidemiológicos de la leptospirosis humana, su vinculación con el reservorio animal en sus principales componentes. Características de las cepas recuperadas.....	90
PERSPECTIVAS.....	97
Sobre la secuencia pasada, presente y futura de las investigaciones.....	97
REFERENCIAS.....	99

Agradecimientos

A todas las personas que facilitaron los estudios y a todas y todos los colegas y amigos que de manera desinteresada aportaron a este trabajo.

Presentación de la Colección Biblioteca Plural

Vivimos en una sociedad atravesada por tensiones y conflictos, en un mundo que se encuentra en constante cambio. Pronunciadas desigualdades ponen en duda la noción de progreso, mientras la riqueza se concentra cada vez más en menos manos y la catástrofe climática se desenvuelve cada día frente a nuestros ojos. Pero también nuevas generaciones cuestionan las formas instituidas, se abren nuevos campos de conocimiento y la ciencia y la cultura se enfrentan a sus propios dilemas.

La pluralidad de abordajes, visiones y respuestas constituye una virtud para potenciar la creación y uso socialmente valioso del conocimiento. Es por ello que hace más de una década surge la colección Biblioteca Plural.

Año tras año investigadores e investigadoras de nuestra casa de estudios trabajan en cada área de conocimiento. Para hacerlo utilizan su creatividad, disciplina y capacidad de innovación, algunos de los elementos sustantivos para las transformaciones más profundas. La difusión de los resultados de esas actividades es también parte del mandato de una institución como la nuestra: democratizar el conocimiento.

Las universidades públicas latinoamericanas tenemos una gran responsabilidad en este sentido, en tanto de nuestras instituciones emana la mayor parte del conocimiento que se produce en la región. El caso de la Universidad de la República es emblemático: aquí se genera el ochenta por ciento de la producción nacional de conocimiento científico. Esta tarea, realizada con un profundo compromiso con la sociedad de la que se es parte, es uno de los valores fundamentales de la universidad latinoamericana.

Esta colección busca condensar el trabajo riguroso de nuestros investigadores e investigadoras. Un trabajo sostenido por el esfuerzo continuo de la sociedad uruguaya, enmarcado en las funciones que ella encarga a la Universidad de la República a través de su Ley Orgánica.

De eso se trata Biblioteca Plural: investigación de calidad, generada en la universidad pública, encomendada por la ciudadanía y puesta a su disposición.

Rodrigo Arim

Rector de la Universidad de la República

In memoriam Felipe Schelotto

5 de febrero de 1946-4 de diciembre de 2022

Decano de la Facultad de Medicina, director del Departamento de Bacteriología y Virología, director del Instituto de Higiene, impulsor de este y de otra gran cantidad de trabajos, promotor de la formación de grupos multidisciplinarios de investigación, compañero y amigo. El doctor Schelotto fue ejemplo en lo disciplinario y sobre todo en lo personal para todas y todos quienes tuvieron la suerte de conocerlo y de compartir espacios y tiempo con él. Donde estés,
¡Salud, Felipe!

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial causada por cepas patogénicas del género *Leptospira*. Se suele presentar de forma endémica, aunque pueden ocurrir brotes epidémicos vinculados a inundaciones u otros desastres naturales, así como a eventos masivos donde se practican deportes de aventura o excursiones y turismo en lugares exóticos (Vanasco, Stiefel, Varela y Fritschy, 2005; Munoz-Zanzi *et al.*, 2020; Morgan *et al.*, 2002; Céspedes *et al.*, 2009). La mayoría de los casos se dan en poblaciones vulnerables, expuestas a diferentes factores ambientales de riesgo, como habitar en zonas inundables, sin acceso al agua potable, sin adecuado tratamiento de las aguas residuales; en personas en situación de calle, y en contacto estrecho con animales domésticos o silvestres (Costa *et al.*, 2015). Se estima que a nivel mundial ocurre más de un millón de casos anuales de esta enfermedad en seres humanos y que esta es responsable de casi sesenta mil muertes por año. Sin embargo, se piensa que hay un subregistro de casos en todo el mundo debido, sobre todo, a que la enfermedad se suele confundir con otras patologías principalmente febriles. No se dispone de un sistema de registro unificado y adecuado y, en general, el acceso a pruebas de laboratorio confiables y aplicables en los diferentes niveles de atención para confirmar la infección es limitado (Reller *et al.*, 2014).

La leptospirosis integra el grupo de las enfermedades profesionales —entendidas como aquellas causadas por agentes físicos, químicos o biológicos (en este caso una bacteria) utilizados o manipulados durante la actividad laboral o que están presentes en el lugar de trabajo— descritas en el Decreto 210/011 (Uruguay, 2011). Las y los trabajadores expuestos a leptospirosis son, entre otros, tamberos, peones rurales, cultivadores de arroz, veterinarios, recicladores de neumáticos y de residuos, personal de faena, personal a cargo del mantenimiento del sistema de saneamiento, personal de laboratorio. También integra el grupo B de las enfermedades y eventos sanitarios de notificación obligatoria cuyo CIE es el A27 (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2018).

Las leptospirosis patogénicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Afectan a los seres humanos y a una variedad de animales domésticos destinados a la compañía y a la producción de alimentos —por ejemplo, de la industria cárnica y láctea— e infectan también a un gran número de animales silvestres y peridomésticos de nuestro medio, como roedores, jabalíes y mulitas, o del ambiente marino, como poiquiloterms y varios mamíferos. También se han recuperado cepas patogénicas de *Leptospira* de sapos y ranas, y algunos autores sugieren que estos animales participan en la diseminación de estas bacterias en el ambiente (Haake y Levett, 2015).

La sobrevivencia de *Leptospira* en el agua y en el suelo depende de factores como el pH, la temperatura y la presencia de otras bacterias competidoras. En general, se mantienen viables en un pH cercano a 7 y son inactivadas en ambientes ácidos o alcalinos. Pueden permanecer activas e infectivas en los espejos de agua dulce por períodos prolongados aunque no sobreviven por mucho tiempo en el agua salada. Sin embargo, hay cepas halotolerantes, saprofíticas y patogénicas que pueden favorecer la infección de poiquiloterms y mamíferos marinos (Grüne Löffler *et al.*, 2015).

La patología de muchos animales de producción y las pérdidas económicas que ocasiona han sido por mucho tiempo los principales incentivos para el estudio de esta zoonosis en nuestro medio, pero la enfermedad humana también causa daños relevantes que requieren atención. En este sentido, los seres humanos son considerados huéspedes *accidentales o incidentales* que no transmiten el agente por contacto directo a otros seres humanos. Sin embargo, algunos casos publicados hace décadas dan cuenta de una posible transmisión interhumana vertical transplacentaria, durante la lactancia o por contacto sexual (Harrison y Fitzgerald, 1988).

Por otra parte, la mayoría de los animales actúa como *huésped, reservorio o anfitrión* de mantenimiento de alguna variante. Los más reconocidos universalmente son los pequeños mamíferos, incluyendo varios roedores: ratas, ratones, apereás, nutrias, etc. (Ricardo *et al.*, 2020). En general, las ratas son portadoras de cepas del serogrupo Icterohaemorrhagiae y los ratones, de Ballum. Entre otros animales huéspedes, el ganado bovino suele serlo de los serovares Hardjo o de Kennewicki en algunas regiones; los porcinos de Kennewicki, Tarassovi o Bratislava, y los cánidos de Canicola. En todo el mundo hay variaciones en estas asociaciones entre serovares y huéspedes de mantenimiento, y ellas se pueden modificar en el tiempo. Para estos animales la infección es endémica, lo que permite que el agente se propague con facilidad hacia otros animales de la misma o de otra especie a través de contacto directo o indirecto por agua o por suelo contaminado con orina (figura 1). Debido a que adquieren la infección siendo muy jóvenes, la prevalencia de eliminación crónica por la orina es alta, lo que favorece su diseminación hacia otros animales susceptibles o hacia seres humanos (Bharti *et al.*, 2003).

Los animales criados en diferentes explotaciones productivas (ganado vacuno, cerdos, equinos, etc.) tienen ciclos endémicos de infección por distintos serovares a los que están más o menos adaptados. Sin embargo, animales silvestres u otros animales de producción infectados pueden ingresar a los establecimientos y aportar serovares que producen interacciones más violentas (Haake y Levett PN, 2015).

Las leptospirosis se ubican en gran número en los túbulos proximales renales de los animales hospederos de mantenimiento, que las eliminan por períodos prolongados sin sufrir efectos perjudiciales importantes. Ellos constituyen

el reservorio más importante del agente, y algunos autores indican que la relación entre ambos es de tipo *comensal* (Bharti *et al.*, 2003).

El ciclo básico de circulación de *Leptospira* es el siguiente: eliminación por la orina por parte del huésped de mantenimiento, persistencia en el ambiente, contacto directo o indirecto con otro hospedero (de mantenimiento o incidental), ingreso a este por diferentes puertas de entrada (heridas de piel, mucosas sanas, etc.), desarrollo de leptospiremia con diseminación a los riñones, colonización de la luz y de las células de los túbulos renales proximales y, nuevamente, eliminación urinaria al exterior por períodos prolongados, con escasa o nula sintomatología en el caso de los huéspedes de mantenimiento. Los seres humanos se integran a este ciclo de forma accidental, por contacto directo o indirecto con la orina de estos animales (figura 1) (Bharti *et al.*, 2003).

Así, las leptospirosis ingresan a los seres humanos a través de pequeñas heridas o abrasiones de la piel o de superficies mucosas intactas como la conjuntival. No ocurren manifestaciones evidentes en la puerta de entrada, como sí sucede en las infecciones por otras espiroquetas —por ejemplo, *Treponema pallidum* o *Borrelia burgdorferi*—, a excepción de la característica hiperemia conjuntival (ojo rojo).

Entender la epidemiología y otros aspectos básicos de la leptospirosis requiere de una visión amplia que incluya la participación de un equipo multidisciplinario integrado por veterinarios, médicos, biólogos, zoólogos, asistentes sociales, sanitaristas, ecólogos, climatólogos, entre otros. Esto permite que se destaque la importancia de su abordaje desde el punto de vista de *una salud* (Haake y Levett, 2015).

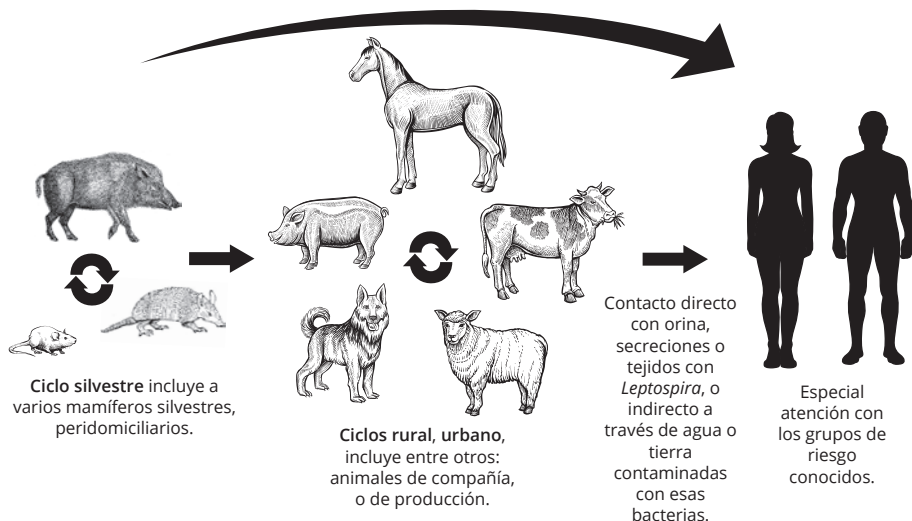


Figura 1. Ciclos que muestran algunos huéspedes de mantenimiento o accidentales de *Leptospira* (animales silvestres o domesticados) y a los seres humanos como anfitriones accidentales.

El agente

El género *Leptospira*, compuesto por cepas altamente variables, pertenece a la familia *Leptospiraceae*, que incluye, además, a los géneros *Leptonema* y *Turneriella* (*Leptospiraceae*, s. f.). Se trata de bacterias delgadas de tamaño variable (0,1 µm de diámetro, rango de longitud de 6-20 µm) con forma espiralada, muy móviles, capaces de pasar filtros con poro de 0,22 µm y con un movimiento típico que se debe a la acción de los flagelos periplásmicos (figuras 2 y 3). No se tiñen con las coloraciones bacteriológicas clásicas aunque se observan muy bien con el microscopio de campo oscuro. Son aerobias, presentan un crecimiento lento, su temperatura óptima está entre los 28 °C y los 30 °C y tienen requerimientos nutritivos especiales. Pueden sobrevivir entre días y meses en ambientes húmedos si no están expuestas a pH o a presiones osmóticas extremas. Tienen una estructura similar a la de las bacterias gramnegativas y, al igual que estas, en la cara exterior de su membrana externa tienen localizadas las moléculas de lipopolisacárido (LPS). Y son las diferencias químicas y estructurales entre los LPS las que constituyen la base para la clasificación de *Leptospira* en serovares y serogrupos (Levett, 2015).

Son clasificables en más de trescientos serovares —definidos de acuerdo a los resultados de pruebas clásicas de microaglutinación con sueros anti-LPS absorbidos— y en cerca de cuarenta genoespecies por estudio de su ADN, más de la mitad de ellas con cepas total o parcialmente patógenas (Thibeaux *et al.*, 2018a; Guglielmini *et al.*, 2019).

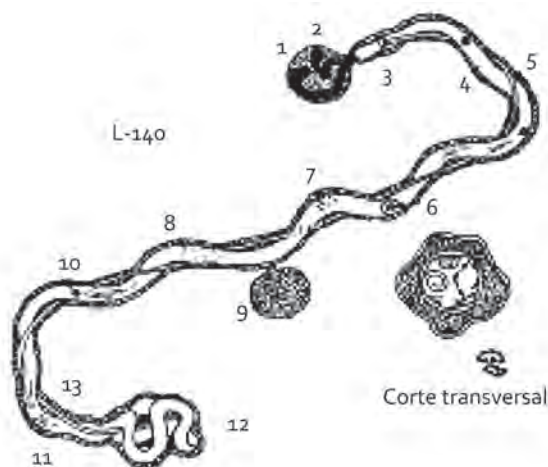


Figura 2. Esquema ultraestructural de *Leptospira*: Formación terminal (1), apéndices terminales (2), gránulo basal (3), cilindro citoplasmático (4), filamentos axiales (5), estructura lamelar (6), inclusiones electrodensas (7 y 10), inclusiones electrodifusas (8), formaciones globosas (9), nucleoide-ADN (11), quiste (12) y membrana externa (13). Corte transversal en marco (De Katz y Ananhin, 1971).

Los serovares que se relacionan de forma antigénica están en el mismo serogrupo. Estos no tienen valor desde el punto de vista taxonómico, pero se utilizan para referirse a las cepas de forma general, como veremos más adelante.

En la síntesis de LPS entre cepas de *Leptospira* se produce un intercambio de genes involucrados, lo que explicaría por qué diferentes especies comparten muchos serovares. Es por este motivo que establecer de manera aislada el serovar de una cepa en estudio no permite conocer la especie que lo porta (Haake *et al.*, 2004). Por ello, lo recomendable es definir primero la especie y la posible serovariedad por métodos de biología molecular (por ejemplo, mediante secuenciación parcial del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, MLVA-VNTR Multiple Locus Variable-number Tandem-repeat Analysis, o mediante secuenciación completa del genoma) y luego determinar por técnicas clásicas de microaglutinación el serovar correspondiente. Este procedimiento requiere de gran cantidad de antisueros de compleja preparación y, por lo tanto, su aplicación se limita a laboratorios de referencia a nivel mundial (Zarantonelli *et al.*, 2018).

Las especies de *Leptospira* se dividen en tres grupos de acuerdo a su potencial patógeno y evolutivo: patógenas, intermedias y saprófitas, y son clasificables mediante Multi-Locus Sequence Typing (MLST) según presencia de diferentes genes *housekeeping*. Las especies patógenas son responsables de la mayoría de las enfermedades severas que ocurren en seres humanos y animales; las intermedias son ubicuas y causan enfermedades leves en ambos grupos de hospederos, y las saprófitas están bien adaptadas a la vida libre, muy distribuidas en la naturaleza y no suelen producir enfermedad (Fouts *et al.*, 2016; Thibeaux *et al.*, 2018b).

La disponibilidad de herramientas de biología molecular y de bases de datos y de análisis bioinformáticos potentes ha implicado rápidos y recientes cambios en la taxonomía de este agente, con la definición de genomoespecies y de nuevos géneros dentro de *Leptospiraceae*, así como el desarrollo de nuevas metodologías que permiten la identificación, la caracterización por MLST, PFGE, la secuenciación de los diferentes aislamientos de *Leptospira* y la valoración de su potencial patógeno (Picardeau, 2017). Estas herramientas tienen, además, una evidente utilidad epidemiológica para el estudio de brotes, la identificación de reservorios y el diseño de vacunas.

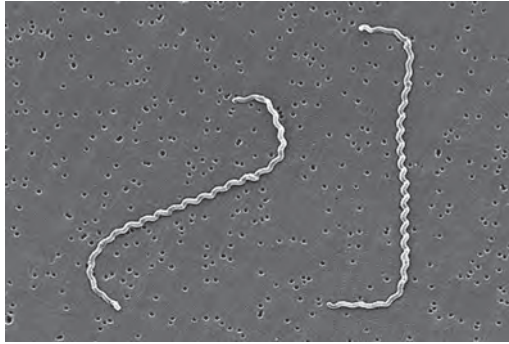


Figura 3. Microfotografía electrónica de barrido de la cepa RGA de *Leptospira interrogans* que muestra claramente los extremos en forma de gancho.

Fuente: Haake *et al.* (2015).

Condiciones para su cultivo en el laboratorio, diferencias entre las de vida libre y las cepas patogénicas

Leptospira es capaz de sintetizar aminoácidos y ácidos nucleicos a partir de sus precursores básicos. Esto la diferencia de bacterias de los géneros *Borrelia* y *Treponema*, que los requieren preformados. Crecen bien en aerobiosis (concentración de oxígeno entre 18% y 21%) y los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) constituyen su principal fuente de carbono. Sin embargo, a concentraciones elevadas los AGCL pueden tener un efecto inhibitor en su crecimiento. Para superar esta situación se agrega suero con albúmina o albúmina bovina purificada a los medios de cultivo. Esta sustancia adsorbe los ácidos grasos y los libera lentamente al medio, lo que produce concentraciones no tóxicas para *Leptospira*.

El agregado de Tween tiene un efecto similar. La temperatura óptima de crecimiento está entre los 28°C y los 30°C, aunque las especies saprófitas, a diferencia de las patógenas e intermedias, se multiplican a temperaturas más bajas (11°C-14°C). El pH óptimo se ubica en el rango de la neutralidad (7,2-7,4), y el tiempo de duplicación *in vitro* de una cepa patogénica es de dieciséis horas y tiene un período de latencia (fase lag) de una a tres semanas hasta el desarrollo de la fase exponencial (Cameron, 2015; Zuerner, 2005; Adler, 2015).

Para el cultivo de *Leptospira* en laboratorio se dispone de una variedad de medios líquidos, semisólidos y sólidos, muchos de origen comercial y otros que se pueden preparar a partir de sus componentes básicos. Cada medio presenta ventajas y desventajas. Algunos tienen el agregado de inhibidores, utilizables cuando se procesan muestras contaminadas —por ejemplo, orina o muestras de agua—. En estos casos, además, se puede explotar el hecho de que, debido a su tamaño, pueden atravesar filtros de 0,22 µm de poro y filtrar estas muestras antes de sembrarlas.

También están disponibles medios de conservación para el almacenamiento prolongado de los cultivos de *Leptospira*.

Manifestaciones clínicas en seres humanos

La leptospirosis es una enfermedad de severidad variable, casi siempre de comienzo agudo, habitualmente autolimitada, con manifestaciones inespecíficas, que muchas veces se confunde con otros procesos febriles de causa viral o bacteriana e incluso con algunas enfermedades no infecciosas. Se divide en dos fases: la primera coincide con la presencia de leptospiras en sangre (fase de leptospiremia) y la segunda con la presencia de anticuerpos circulantes (etapa de leptospiruria, de duración más breve que en los huéspedes de mantenimiento) (Haake y Levett, 2015; Tarantola y Goarant, 2018) (figura 4).

Tiene un período de incubación variable de cinco a quince días que puede llegar a los treinta días. La duración de esta etapa depende de la carga del inóculo bacteriano, del estado de salud del hospedero y de la cepa infectante, entre otros factores conocidos (Morgan *et al.*, 2002).

La mayoría de los pacientes desarrolla formas asintomáticas o con manifestaciones leves en el tubo digestivo (dolor abdominal, vómitos o diarrea), tracto respiratorio (tos seca, no productiva) u otras como cefaleas, dolores musculares y articulares u orinas espumosas por proteinuria. Con frecuencia, quienes se enferman no requieren o no buscan atención del personal de salud, lo que contribuye al subregistro de casos. Muchas personas presentan hipereimia conjuntival, signo casi patognomónico de la enfermedad; sin embargo, su ausencia no permite descartar la infección por *Leptospira*. La erupción cutánea es rara y, cuando aparece, sugiere el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas (dengue o chikungunya) (Zaki *et al.*, 2010). *Leptospira* también es agente de complicaciones neurológicas como meningitis aséptica con LCR claro, y en algunas regiones del mundo es el agente asociado más frecuentemente con esta patología (Silva *et al.*, 2002).

Entre un 5 % y un 10% de los pacientes puede desarrollar la forma icterica severa con compromiso de varios órganos, denominada enfermedad de Weil. Esta entidad tiene una letalidad cercana al 10%. Muchos de estos pacientes presentan un síndrome hemorrágico (equimosis, petequias o sangrados severos a nivel digestivo o pulmonar) (Wagenaar *et al.*, 2010) y pueden desarrollar insuficiencia circulatoria (*shock*) acompañada por un síndrome de dificultad respiratoria severo (Breijo *et al.*, 2006; Jayakrishnan *et al.*, 2013).

La infección grave por *Leptospira* también se asocia con el síndrome de hemorragia pulmonar severa (SHPS) que puede ocurrir de forma aislada o como brotes y que en ocasiones se confunde con infección por hantavirus (Yersin *et al.*, 2000).

Otros pacientes presentan en la etapa de recuperación con título elevado de anticuerpos circulantes compromiso ocular (*uveítis*), uni o bilateral, de severidad variable, que puede ser aguda y autolimitada o recurrente con episodios agudos repetidos en el tiempo (Verma y Stevenson, 2012).

Aunque la enfermedad por *Leptospira* se describe como aguda y autolimitada, un porcentaje variable de pacientes padece síntomas durante meses o años luego de una infección aguda confirmada y no está claro si se trata de una infección crónica o trastornos de tipo autoinmune (Goris *et al.*, 2013). Estas personas relatan dolores musculares que aparecen y desaparecen, fatiga crónica, cefaleas recurrentes y desgano para desarrollar tareas de la vida cotidiana.

A su vez, la infección por un serovar no produce protección cruzada (inmunidad heteróloga) contra la infección con otros serovares no relacionados con los que originaron la primera infección, por lo que un paciente puede padecer otras infecciones, sintomáticas o no, luego de recuperarse de la que se esté tratando.

Tratamiento con antibióticos

La mayoría de las y los pacientes con leptospirosis se recupera, incluso en algunos casos sin tratamiento específico con antibióticos. La pertinencia del tratamiento antimicrobiano, de hecho, ha sido largamente discutida tanto en nuestro medio como en el mundo, porque se consideraba que el componente principal del daño patológico era la intensa respuesta inmune y no la acción directa o la proliferación microbiana. No obstante, se reconoce en la actualidad que el inicio temprano del tratamiento antibiótico está indicado con claridad, en tanto previene el desarrollo de formas severas de la enfermedad y que muchos pacientes dejen de eliminar el agente con rapidez por la orina. Por estas razones, el tratamiento empírico se debe iniciar, incluso antes de tener la confirmación laboratorial de la infección, con base en aspectos clínicos y epidemiológicos, sobre todo en aquellas personas que presentan riesgo de padecer formas graves de la enfermedad, como se verá más adelante (Breijo *et al.*, 2006; Haake y Levett, 2015).

Entre los antibióticos más usados para el tratamiento de esta enfermedad están la penicilina, la ampicilina y las cefalosporinas de tercera generación, que se administran por vía intramuscular o intravenosa en pacientes que requieren hospitalización (Panaphut *et al.*, 2003). La doxiciclina y la azitromicina también se pueden usar en personas adultas que reciban tratamiento ambulatorio. La doxiciclina se ha empleado como quimioprofilaxis en brotes epidémicos (Katelaris *et al.*, 2020), pero su eficacia e inocuidad son controvertidas, por lo que en niñas y niños y en mujeres embarazadas se usa la amoxicilina.

Factores asociados con el desarrollo de síntomas severos y una evolución desfavorable

En hombres mayores de 36 años, la insuficiencia respiratoria y la confusión mental en la etapa aguda de la enfermedad se han reportado como asociados a un aumento significativo de la letalidad (Pappachan *et al.*, 2004). La presencia de oliguria, hiperkalemia, estertores pulmonares o hipotensión al ingreso hospitalario se han señalado como indicadores de alto riesgo de muerte (Panaphu *et al.*, 2002).

Enfermedad en los animales

La infección de los animales está ampliamente distribuida y estos constituyen el reservorio principal para los casos en seres humanos (figura 1).

Pueden sufrir infecciones agudas o crónicas que ocurren tanto en animales salvajes como domesticados destinados a compañía, trabajo, deporte o producción de alimentos. Diferentes animales pueden actuar como hospederos de mantenimiento de distintos serovares con infección crónica, sin presentar manifestaciones clínicas evidentes y con eliminación renal por períodos prolongados, o pueden infectarse con otros serovares. En general, estas últimas infecciones determinan enfermedades agudas de gravedad variable, que pueden ocasionar incluso la muerte del animal, y que presentan excreción renal de duración limitada. Los animales se infectan a través de la mucosa oral, ocular, nasal o incluso por vía sexual. También ocurre transmisión vertical (placenta, leche).

Luego de la etapa de bacteriemia las leptospiras se ubican en las células y en la luz de los túbulos contorneados proximales renales y son eliminadas al exterior por la orina, cerrando el ciclo de transmisión. La eliminación puede ser permanente o periódica y puede durar toda la vida del animal. Estas bacterias también pueden persistir por períodos prolongados en el oviducto, en el útero, en las glándulas mamarias de las hembras y en el tracto genital de los machos. También ocurren infecciones crónicas oculares, sobre todo en equinos (Faine, Adler, Bolin y Perolat, 2000; Petrakovsky, Bianchi, Fisum, Nájera-Aguilar y Pereira, 2014). Por su parte, el ganado vacuno es huésped de mantenimiento de los dos subtipos del serovar Hardjo, Hardjobovis y Hardjoprajitno, que tienen la capacidad para persistir por períodos prolongados en el tracto genital de vacas y toros, lo que los vuelve transmisibles por vía sexual (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

La infección aguda con cepas del serovar Hardjo suele tener manifestaciones clínicas leves. En vacas lecheras se asocia a la disminución de la producción y a la presencia de sangre en la leche. También se vincula con

abortos tardíos que ocurren de seis a doce semanas luego de la infección, partos prematuros y terneros de bajo peso (Petrakovsky *et al.*, 2014).

Las cepas del serovar Kennewicki, por su parte, se encuentran con frecuencia en condición de mantenimiento o accidental en rodeos del continente americano. Los bovinos también se pueden infectar de forma incidental con cultivos pertenecientes a los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica, Tarassovi, Grippotyphosa, entre otros. Varios de ellos se asocian con enfermedades severas, sobre todo en animales jóvenes y hembras preñadas, que causan «tormentas de abortos» en los predios productivos (Lilenbaum y Martins, 2014).

Asimismo, la leptospirosis es común en cerdos. Estos animales pueden ser huéspedes de mantenimiento de una variedad de serogrupos entre los que se encuentran Australis, Pomona y Tarassovi, y, además, pueden ser anfitriones incidentales de cepas de los serogrupos Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, entre otros. Las formas severas de la enfermedad se ven en los animales más jóvenes. En cambio, los machos adultos padecen formas leves, incluso asintomáticas, y pueden eliminar las leptospiras en la orina por años (Haake y Levett, 2015; Caffarena, Agorio y Barriola, 1966).

Los caballos, por su parte, se infectan de forma incidental con un amplio rango de serovares (Pinto, Libonati y Lilenbaum, 2017; Divers, Chang, Irby, Smith y Carter, 2019). Esta infección tiene un impacto negativo en el agronegocio equino, principalmente por las pérdidas debidas a abortos, mortinatos, y, además, produce un peor desempeño atlético en los caballos de carrera a causa de la infección subclínica (Hamond *et al.*, 2012).

A pesar de que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, en los casos con sintomatología las manifestaciones clínicas en los equinos son similares a las observadas en el ganado bovino. La forma más leve de presentación de la enfermedad es un cuadro con fiebre, apatía y anorexia. En las formas más graves puede darse sufusión conjuntival, ictericia, anemia y hemorragias petequiales en la mucosa. En potros puede ocurrir insuficiencia renal e ictericia o una falla respiratoria aguda, que son raras en caballos adultos (Timoney *et al.*, 2011). También puede afectar la reproducción causando abortos, mortalidad perinatal y nacimiento de potros prematuros (Jaeger *et al.*, 2019; Hamond *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2020). Los abortos por leptospirosis ocurren en la última etapa de la gestación, sin ningún síntoma clínico previo, por lo general. Luego de la infección aguda, algunos animales pueden desarrollar uveítis recurrente e incluso llegar a la pérdida de la visión. Esta patología se atribuye a fenómenos autoinmunes y a la infección crónica en el humor vítreo. Ocurre meses o años después de la infección, y puede ser uni o bilateral (Braga, Hamond, Martins, Abreu y Lilenbaum, 2011; Fischer *et al.*, 2019; Hartskeerl *et al.*, 2004). En la fase inicial se manifiesta mediante miosis, blefaroespasmos, fotofobia, lagrimeo y, ocasionalmente, queratitis. Entre

las infecciones crónicas pueden aparecer coriorretinitis, cataratas, decoloración del cristalino, alteración del color del iris, sinequia y glaucoma.

Los perros son huéspedes de mantenimiento de cepas del serovar Canicola, entre otras, y sufren infecciones incidentales por cultivos, por ejemplo, del serogrupo Icterohaemorrhagiae. La mayoría de las infecciones son leves, aunque pueden presentar formas severas con compromiso pulmonar, acompañadas o no de ictericia. Al igual que ocurre con los caballos, algunos perros pueden desarrollar uveítis recurrente con pérdida de la visión. La leptospirosis canina, su prevención por vacunación y el eventual riesgo para los responsables o personas próximas es preocupación frecuente de las y los veterinarios urbanos dedicados a pequeños animales en nuestro país, pero no se atiende de la misma manera en ambientes rurales o en actividades económicas informales vinculadas a ecosistemas variados (Miraglia *et al.*, 2013; Bertasio C *et al.*, 2020; Suepaul, Carrington, Campbell, Borde y Adesiyun, 2010).

Los roedores en general, pero sobre todo la rata marrón (*Rattus norvegicus*), son huéspedes de mantenimiento de cepas de los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni. Otras especies que habitan zonas rurales o de bosques pueden ser portadoras de cepas de los serogrupos Autumnalis, Ballum, Canicola y Grippotyphosa. Los roedores son considerados portadores universales de *Leptospira* y muchos casos de la enfermedad en seres humanos y otros animales están asociados al contacto directo o indirecto con su orina (Boey, Shiokawa y Rajeev, 2019; De Faria *et al.*, 2008; Agudelo-Flórez *et al.*, 2009), aunque no siempre se los reconoce como el reservorio principal de estas infecciones (Biscornet *et al.*, 2017; Loan *et al.*, 2015).

Existe otro conjunto importante de animales, sobre todo mamíferos —aunque también se han encontrado reptiles, batracios y peces (Mgode, Mhamphi, Katakweba y Thomas, 2014)— que participan del ciclo de la leptospirosis.

Prevención

Las medidas de prevención están basadas sobre todo en el conocimiento del amplio reservorio, de la epidemiología y de los mecanismos y las vías de transmisión de *Leptospira*. Algunos grupos de personas tienen mayor riesgo de entrar en contacto con el agente, de infectarse y de desarrollar la enfermedad. Las medidas que evitan el contacto de *Leptospira* con la piel y las mucosas de las personas expuestas —como el uso de los lentes de seguridad, las botas de goma, los guantes, la ropa de trabajo adecuada y las medidas de higiene personal, entre otras— son efectivas y ampliamente utilizadas. La construcción de viviendas dignas en zonas seguras no inundables, con acceso al agua potable y con disposición final segura de las aguas servidas y desechos; el control de roedores, y los programas de educación sobre el agente, la enfermedad y su transmisión son medidas de control eficaces aplicables a todos los serovares.

La identificación y la reducción de la carga infecciosa de los reservorios animales y de los animales de compañía, de trabajo y de producción a través de la captación y del tratamiento de aquellos infectados y del uso de vacunas son estrategias fundamentales en los programas de control de la enfermedad. Para esto, se requiere el conocimiento previo de los serovares o serogrupos prevalentes, ya que, como vimos, las vacunas son eficaces contra los serovares que la integran y contra aquellos relacionados antigénicamente.

En Uruguay existen vacunas comerciales preparadas con leptospiras enteras inactivadas (bacterinas) de varios serovares, que se utilizan en vacas, cerdos o perros y ocasionalmente en otros animales. Así, Bioleptogen®, formulada para su uso en cerdos y vacas, contiene una suspensión acuosa de los serovares Canicola Canicola, Icterohaemorrhagiae Copenhageni, Grippotyphosa Grippotyphosa, Pomona Pomona, Sejroe Hardjo, Australis Bratislava y Tarassovi Tarassovi de *Leptospira interrogans*. Por su parte, Providean® Lepto 8® contiene los serovares Pomona, Canicola, Hardjo, Wolffi, Bratislava e Icterohaemorrhagiae de *Leptospira interrogans*; Tarassovi de *Leptospira borgpetersenii*, y Grippotyphosa de *Leptospira kirschneri* (Adler, 2015). La vacuna Vac-Sules Lepto 11® contiene suspensiones de los serovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Copenhageni, Pomona, Wolffi, Grippotyphosa, Tarassovi, Hardjo, Pyrogenes, Bataviae y Hardjo bovis e incluye adyuvante oleoso y timerosal como conservante.

Asimismo, Bovisan Lepto 8®, contiene suspensión inactivada de *Leptospira interrogans*, serovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo tipo Hardjo-prajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffi; de *Leptospira borgpetersenii*, serovar Hardjo tipo Hardjo-bovis; hidróxido de aluminio 10%, y timerosal como conservante.

Existen cinco vacunas licenciadas para uso en seres humanos. La de origen cubano, vax-SPiRAL®, se desarrolló en el Instituto Finlay y contiene tres

serovares: Canicola, Copenhageni y Mozdok. La francesa, monovalente, Sanofi-Pasteur®, incluye cepas del serogrupo Icterohemorrhagiae. La japonesa incluye cepas de los serovares Australis, Autumnalis, Hebdomadis y Copenhageni. La de origen chino, producida en el Wuhan Institute of Biological Products, es la que contiene el mayor número de serovares: Lai, Linhai, Autumnalis, Canicola, Pomona, Hebdomadis y Australis. Estas cuatro vacunas están constituidas por cepas inactivadas. La quinta, desarrollada también en China por el Institute of Biological Products, está formada por antígenos de la envoltura externa de cepas de los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Hebdomadis (Xu y Ye, 2018). La vacunación con estos productos no es de uso general obligatorio, sino que su aplicación se recomienda en personas con riesgo laboral o de forma más amplia en situaciones epidémicas particulares, inundaciones, terremotos, brotes extensos, etc. Al igual que como ocurre con la infección natural, la protección que confieren estas vacunas es específica contra los serovares que las componen o contra aquellos muy relacionados antigénicamente (Xu y Ye, 2018).

Conocimientos sobre leptospirosis en el personal de salud humana y animal

En Uruguay, el conocimiento en general sobre esta zoonosis y su epidemiología, así como el manejo, el tratamiento y la prevención están poco difundidos entre el personal de salud, y esto es un deber pendiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República y del sistema de salud uruguayo en general, en tanto la autoridad sanitaria de nuestro país no considera prioritaria la investigación que permita el avance del conocimiento en el tema. Prueba de esto es que, mientras que en actividades de difusión y de extensión con intención preventiva suele haber una amplia participación de trabajadores, productores rurales, docentes, veterinarios y la población en general, la intervención del personal de salud humana es muy reducida o nula.

Es así que personal médico y veterinario cuentan con un conocimiento general correcto sobre distintos aspectos de esta afección. Sin embargo, respecto a las variables del reservorio y la transmisión de la enfermedad, su información es incompleta: consideran, en general, a la población de ratas como único componente de riesgo del reservorio animal y no identifican a la orina animal y a los líquidos contaminados con ella precisamente como fuente principal de infección.

En el mismo sentido, en la práctica profesional, no es frecuente que se considere a la leptospirosis como posible diagnóstico, aun en poblaciones de riesgo y frente a cuadros clínicos compatibles, como tampoco está suficientemente difundida la disponibilidad del diagnóstico de laboratorio, aunque se haya avanzado bastante en ello.

Impactos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el grupo de Estudio de la Carga Mundial de Enfermedades usan los años de vida perdidos por discapacidad (DALY, por sus siglas en inglés) como indicador para estimar el impacto de una enfermedad. Los DALY son un indicador que permite la comparación directa entre problemas de salud pública en términos comunes, que reflejan principalmente el impacto en la capacidad productiva económica de un grupo humano. Y son el resultado de la suma del número de años de vida perdidos debido a la mortalidad (AVP) y del número de años vividos con una discapacidad (AVD) debida a esa enfermedad. Un DALY equivale a un año de vida saludable perdido. La carga mundial por leptospirosis se estima en 2.900.000 DALY al año, que se traduce en 2.800.000 AVP y 103.200 AVD. A su vez, el impacto de la leptospirosis es mayor en poblaciones pobres con necesidades básicas insatisfechas (NBI), entre las que se consideran las que habitan en zonas de África, de América Central y de América del Sur (Torgerson *et al.*, 2015). Este indicador permite la comparación directa entre problemas de salud pública en términos comunes, que reflejan sobre todo el impacto en la capacidad productiva económica de un grupo humano.

Diagnóstico de laboratorio

Varios procedimientos de laboratorio permiten confirmar la infección por *Leptospira*. Se pueden agrupar de forma clásica en métodos indirectos que ponen de manifiesto la respuesta inmune al agente, o directos, que permiten la recuperación del agente o detectan la presencia de su genoma u otras moléculas que lo integran.

Métodos indirectos

Durante mucho tiempo, el diagnóstico etiológico se hizo demostrando la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en el suero de las y los pacientes, utilizando técnicas como reacciones de aglutinación, ELISA, inmunofluorescencia, tests inmunocromatográficos para la detección de IgM e IgG o la microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés) (Haake y Levett, 2015).

En la prueba de MAT el suero de los pacientes se enfrenta con un panel de quince a veinte leptospirosis vivas correspondientes a diferentes serovares. La MAT muestra anticuerpos aglutinantes serogrupo-específicos y no permite definir el serovar infectante cuando se analizan muestras tempranas (figura 4) (Murray *et al.*, 2011). Atendiendo a las distintas etapas de la historia natural de la infección (figura 4), un resultado negativo por MAT en los primeros días de la enfermedad, cuando el nivel de anticuerpos es bajo, no descarta la

infección por *Leptospira*. Es por ello que, para la confirmación de una infección aguda, sintomática o no, se requiere el estudio por MAT de dos sueros consecutivos, uno de fase aguda y otro de fase convaleciente (a veces, en caso de dudas, se analiza una tercera muestra), porque el ascenso de los títulos de anticuerpos revelables por MAT no es inmediato. Por lo tanto, en muchos casos el diagnóstico por este procedimiento es retrospectivo. Además, esta técnica no está disponible en todos los laboratorios de microbiología debido a que las cepas del panel necesitan un mantenimiento particular y que se requiere un microscopio de campo oscuro para la lectura de las microaglutinaciones y personal entrenado en la interpretación de los resultados.

Sin embargo, debido a la plasticidad de la MAT para modificar el panel de serovares ensayados, que permite diagnosticar la infección en distintos animales y su utilidad en los estudios seroepidemiológicos, es la técnica de referencia estándar contra la cual se comparan los otros procedimientos de diagnóstico (Haake y Levett, 2015).

Es así que como alternativa se han desarrollado y aplicado diferentes ensayos de tamizaje más simples, basados, como en el caso de la MAT, en reacciones antígeno-anticuerpo. Muchos son de origen comercial y otros se preparan en el ámbito local. Los anticuerpos de tipo IgM aparecen temprano en la evolución de la infección (figura 4), por lo que su determinación por ELISA, ensayos de aglutinación, tests inmunocromatográficos (IC) o inmunofluorescencia indirecta (IFI) se aplica al diagnóstico temprano mediante el análisis de una sola muestra de suero. Los principales inconvenientes de estos procedimientos son la adecuación de los antígenos usados (la prevalencia de los distintos serovares varía según la región o zona analizada, por lo cual no hay antígenos universales), la presencia frecuente de IgM por un tiempo prolongado más allá de la etapa aguda, la infraestructura de laboratorio necesaria para ELISA e IFI y el número de reacciones cruzadas que pueden tener con otros agentes infecciosos.

La IFI es una técnica rápida, de ejecución e interpretación relativamente fáciles en comparación con la MAT que no requiere trabajar con bacterias vivas en la etapa de ejecución del procedimiento y lectura de los resultados. Permite, además, diferenciar la presencia de anticuerpos de tipo IgM presentes sobre todo en las primeras etapas de la infección o de tipo IgG como indicador de infecciones pasadas. Tiene el inconveniente de que se precisan un microscopio de luz UV para la lectura de sus resultados y técnicos experimentados en ella (Aricapa, Pérez, Cabrera y Rivera, 2008; Meny, Hernández, Schelotto y Varela, 2014).

Los tests IC o de Dot Blot permiten la detección sencilla y rápida de anticuerpos de tipo IgM o IgG (Haake y Levett, 2015). No obstante, estas pruebas tienen limitaciones para el diagnóstico temprano de la infección, por lo que, en caso de resultados positivos y sobre todo negativos, es recomendable confirmarlos por MAT sobre la misma muestra o sobre una solicitada días después.

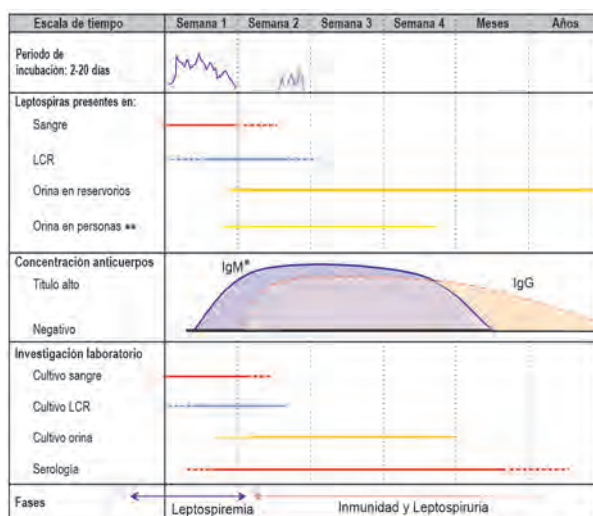


Figura 4. Historia natural de la infección por *Leptospira*.

Fuente: Céspedes (2005). (*) Los anticuerpos de tipo IgM pueden durar varios meses después de una infección aguda. (**) La etapa de leptospiruria es notoriamente más breve en los seres humanos.

Métodos directos

Aislamiento e identificación de *Leptospira*

Las leptospiras en general y las asociadas con la enfermedad en seres humanos, y en animales en particular, son difíciles de cultivar en laboratorio, pues requieren medios de cultivo especiales con agregado de factores de crecimiento, agentes detoxificantes, temperaturas de incubación entre 28 °C y 30 °C, así como períodos de incubación prolongados (de hasta doce semanas o más para descartar un cultivo como negativo). Las leptospiras se pueden recuperar a partir de muestras de sangre obtenidas en las primeras etapas de la infección (fase leptospirémica) (figura 4). Así, un par de gotas de sangre obtenidas por punción venosa se pueden sembrar directamente a «los pies de la cama» del paciente en medios apropiados para *Leptospira* como el EMJH (medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) o colocar un volumen adecuado de sangre en tubos estériles con los anticoagulantes recomendados, y enviar con rapidez y a temperatura ambiente a un laboratorio de referencia. Si el hemocultivo se siembra por error en los medios de rutina, también se pueden enviar los frascos al laboratorio de leptospirosis para resembrarlo en medios apropiados.

En este mismo sentido, otras muestras a partir de las cuales se pueden recuperar leptospiras son la orina, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y, más raramente, el líquido peritoneal o humor acuoso. Del mismo modo, los medios de cultivo líquidos o semisólidos con el agregado de inhibidores como

el EMJH-5FU (medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris con 5-fluorouracilo) son útiles para inocular con muestras en las que se sospecha contaminación por otras bacterias de crecimiento rápido.

Si bien desde el punto de vista clínico individual no vale la pena tanto esfuerzo, ya que la demora que requiere el cultivo no modifica la conducta terapéutica inicial, desde el punto de vista epidemiológico la recuperación de las cepas infectantes tiene un valor enorme. Esto se debe a que el cultivo permite su caracterización completa, la comparación fenotípica y genotípica de aislamientos de diferentes orígenes, los estudios de susceptibilidad a los antibióticos, los ensayos de virulencia en modelos animales, la selección de cultivos para el diseño de nuevas vacunas y la inclusión de nuevas cepas circulantes en el panel MAT, en ELISA o en IFI para diagnóstico serológico.

Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

Numerosos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (AAN) se han aplicado para el diagnóstico de las infecciones por *Leptospira*. Las muestras que se han utilizado para ello incluyen sangre, orina, LCR, humor acuoso y también secciones de diferentes órganos o tejidos obtenidos post mortem. Los ensayos AAN se clasifican de acuerdo al blanco que detectan en dos categorías: de género (aquellos que amplifican genes que están presentes en las cepas saprófitas y las patogénicas) y los que permiten identificar los cultivos patogénicos y que tienen como blanco de amplificación genes de virulencia como *lipL32* o *lfbI*, entre otros. Procedimientos de este tipo fueron evaluados en Tailandia y se confirmaron hallazgos previos sobre su utilidad para el diagnóstico temprano a partir de muestras de sangre en período leptospirémico. Estos métodos son incluso más sensibles que el hemocultivo, y, sin embargo, la MAT aplicada a muestras de suero tomadas posteriormente detectó más casos (Thaipadunpanit *et al.*, 2011). Por lo tanto, un resultado negativo por AAN en muestras obtenidas de forma temprana no descarta la infección por *Leptospira*. Una limitación importante de estos ensayos convencionales de AAN es que no permiten identificar el serovar infectante.

Por último, los procedimientos de secuenciación completa del genoma sí permitirían la determinación de la especie y del serovar infectante. Sin embargo, los resultados de estos ensayos se deben interpretar con cautela.

Caracterización de los aislamientos de *Leptospira*

Técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo

Para establecer de forma definitiva el serovar de los cultivos en estudio se requiere la utilización de una gran cantidad de sueros hiperinmunes policlonales obtenidos en conejos. Este procedimiento de MAT inversa, sumamente laborioso, denominado CAAT por su nombre en inglés (Cross Agglutination Absorption Test) es el reconocido como *patrón de oro* y solo se lleva a cabo en algunos laboratorios de referencia (Mgode *et al.*, 2015). No obstante, otras técnicas de aglutinación que utilizan anticuerpos monoclonales permiten la serotipificación de forma rápida. Sin embargo, los resultados deben interpretarse con cuidado, ya que estos anticuerpos reconocen pequeños epítopos presentes en el LPS que pueden ser compartidos por varios serovares.

Técnicas de huella dactilar (fingerprinting) basadas en reacciones de AAN y en digestión de ADN

Existe una variedad de procedimientos basados en tecnología del ADN que permiten caracterizar y comparar aislamientos de *Leptospira*. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos aplicado las técnicas clásicas de Multi Locus Variable number tandem-repeat Analysis, (MLVA), Multi Locus Sequence Typing (MLST) y RAPD PCR (Amplificación al azar de ADN polimórfico). También utilizamos el ensayo de electroforesis en campos pulsados (PFGE, por su nombre en inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis).

La PFGE consiste en la digestión del ADN cromosómico con una o varias enzimas de restricción y luego la separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa sometidos a un campo eléctrico pulsante con orientaciones alternantes. Se obtienen patrones de bandas de buena definición que, luego de la tinción con bromuro de etidio, son fotografiados y comparados utilizando el programa BioNumerics® (Galloway y Levett, 2010; Loureiro *et al.*, 2020).

Para MLVA se utilizan varios pares de cebadores para amplificar y determinar el número de repeticiones presentes en loci diferentes, que permiten caracterizar cepas de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaün, Mérien, Gurianova, Baranton y Picardeu, 2006).

En la técnica de RAPD-PCR se hace una amplificación al azar utilizando temperaturas de hibridación muy permisivas y cebadores inespecíficos pequeños, de unos diez nucleótidos y de uno o varios tipos moleculares diferentes, que se unen a distintas secuencias blanco y generan amplicones de distintos tamaños, característicos de diferentes variantes microbianas (García-González *et al.*, 2019).

En el ensayo de MLST se amplifican fragmentos internos de siete genes *housekeeping* (*glmU*, *pntA*, *pfbB*, *caiB*, *mreA*, *sucA* y *tpiA*) que luego son secuenciados. Las secuencias obtenidas se comparan con secuencias conocidas para determinar el perfil alélico y el secuenciotipo de la cepa en estudio (Ahmed *et al.*, 2006). El procedimiento ha evolucionado en combinación con técnicas de secuenciación genómica completa (Grillová y Picardeau, 2020).

Más ampliamente, las técnicas de secuenciación comparativa de ciertos genes (*rrs*, *secY*) o del genoma completo permiten la identificación de los aislamientos y su clasificación en estudios de epidemiología molecular de la leptospirosis humana o animal (Soares *et al.*, 2020).

Recientemente, hemos incluido el estudio del genoma completo, un procedimiento que requiere el uso de herramientas de bioinformática para el ensamblaje y análisis de los genomas, e integrantes jóvenes de laboratorio están adquiriendo destrezas y experiencia en este tema. Una limitante importante es que se necesitan equipos complejos e insumos caros. Por el momento, la secuenciación completa de los genomas de *Leptospira* se ha hecho contratando y pagando servicios en el exterior o en colaboración con otros laboratorios.

Objetivo

El objetivo general de este trabajo es comunicar los resultados del estudio desarrollado durante veinte años por nuestro equipo multidisciplinario sobre la leptospirosis y el agente *Leptospira*, poco atendidos por el personal de salud humana, y sobre el amplio reservorio animal que alberga estos gérmenes. Además, se busca transmitir los conocimientos obtenidos con el enfoque una salud sobre la vinculación entre los dos campos de difusión de estas infecciones, con el fin de optimizar orientaciones sobre su manejo, prevención y control.

Nuestros propósitos de trabajo iniciales fueron acercar al laboratorio de microbiología médica los procedimientos necesarios para practicar el diagnóstico de leptospirosis humana y avanzar en el conocimiento clínico-epidemiológico de esta afección en el país. Esto estaba en sintonía con la iniciativa de colegas del interior involucrados en el manejo de pacientes infectados (Filippini, Parada, Schelotto, Zampedri y Lobato, 2003).

Los objetivos concretos o específicos de nuestro primer proyecto de investigación fueron:

- estimar la incidencia de la infección por *Leptospira* en seres humanos;
- determinar aspectos de la epidemiología local y conocer los síntomas y signos presentes en la población local infectada;
- establecer el valor de la inmunofluorescencia indirecta por comparación con la MAT para anticuerpos totales como herramienta para el diagnóstico de la infección humana por *Leptospira*, y
- trasladar los conocimientos adquiridos a pobladores de distintas zonas del país, referentes sociales, profesionales, técnicos y autoridades sanitarias en el territorio, para promover la prevención, la alerta precoz y el control de la leptospirosis humana.

En sucesivos trabajos complementarios nos propusimos:

- evaluar la utilidad de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta de preparación local para detectar anticuerpos IgM (IFI-IgM) en su aplicación al diagnóstico temprano de leptospirosis;
- determinar la aplicabilidad en el diagnóstico rápido de infección por *Leptospira* de una prueba inmunocromatográfica comercial que detecta anticuerpos IgM e IgG, y
- establecer el comportamiento de un ensayo de qPCR (PCR en tiempo real) con SYBRGreen en muestras de sangre para el diagnóstico temprano de leptospirosis humana.

Reconociendo retrasos metodológicos en el aislamiento e identificación de las cepas infectantes locales y en la implementación de métodos serológicos alternativos de diagnóstico, orientamos en nuestro laboratorio del Instituto de

Higiene las tesis de grado de estudiantes de Bioquímica de la Universidad de la República tituladas:

Cultivo de *Leptospira* y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR y

Valoración del rendimiento diagnóstico como test serológico rápido de un procedimiento de aglutinación macroscópica en lámina, utilizando un antígeno termorresistente preparado localmente, y de un ensayo de ELISA, sensibilizado con antígenos leptospíricos preparados localmente también como test serológico rápido.

A partir de las carencias en el enfoque médico de esta infección/enfermedad, acompañamos el trabajo monográfico de un grupo de estudiantes de Medicina en el marco del Ciclo de Metodología Científica II de la carrera titulado: *Evaluación Comparativa del Conocimiento del Personal Médico y Veterinario sobre Leptospirosis Humana en Uruguay*. Sus objetivos fueron describir y comparar los conocimientos sobre epidemiología, clínica, diagnóstico y prevención de la leptospirosis humana de médicos veterinarios y médicos del área humana en Uruguay.

Cumplida la meta de delinear el panorama general de la situación de esta zoonosis en el país, fue necesario plantearse objetivos avanzados:

- establecer la seroprevalencia de infección por *Leptospira* en diferentes grupos humanos en riesgo, reconocer los serovares reactivos por MAT, conocer la importancia relativa de factores de riesgo conocidos para adquirir la infección y establecer el impacto de la infección en esos grupos humanos;
- sensibilizar a las autoridades sanitarias y referentes sociales a propósito de esta enfermedad para favorecer la aplicación de medidas de prevención;
- progresar en el aislamiento y la caracterización de cepas de *Leptospira* recuperadas de hemocultivos humanos, muestras ambientales, orina y órganos animales para saber la prevalencia en el país de diferentes especies y variantes, noción que hasta el momento era solo conocimiento impreciso e indirecto obtenido a partir del estudio de anticuerpos específicos en suero, y
- estudiar en detalle el reservorio animal y la difusión ambiental de cepas de *Leptospira*, ampliando el aislamiento y la identificación molecular de cepas recuperadas en cultivo.

Inicialmente, la tarea se encaró por iniciativa propia y con apoyo de la Fundación Manuel Pérez. Luego se combinó con diversas instituciones y equipos de investigadores en el proyecto Alianza ANII 2015-2018 «Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira* aisladas de casos de Leptospirosis bovina en Uruguay», cuyo objetivo general de este proyecto fue aislar, identificar y tipificar las especies de *Leptospira* provenientes de casos de infecciones agudas o crónicas en el ganado bovino en Uruguay mediante

técnicas de microbiología tradicional, métodos serológicos y métodos moleculares. Se entendió que el alcance exitoso de este objetivo podría contribuir a mejorar la eficacia de las vacunas veterinarias contra *Leptospira* usadas en el país por la incorporación de antígenos de serovares locales.

Con el apoyo del Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República nos propusimos, luego, producir nuevos conocimientos que contribuyeran al control de los daños económicos y sanitarios de la leptospirosis. Para ello, estudiamos la prevalencia y características de las infecciones por *Leptospira* en poblaciones equinas y en roedores, como parte del reservorio microbiano.

Más extensamente, nuestros objetivos recientes fueron investigar y evaluar la presencia y difusión de la leptospirosis en equinos y trabajadores que están en contacto con ellos en distintos establecimientos y ámbitos laborales. También pretendimos determinar la prevalencia de la infección y la enfermedad en poblaciones de equinos de nuestro país y qué serovares son más frecuentemente reactivos por MAT en equinos y en trabajadores infectados de los distintos establecimientos, evaluar la potencialidad de los equinos como fuente de infección para la transmisión de la enfermedad en trabajadores expuestos, identificar el patrón epidemiológico y los factores de riesgo asociados a la enfermedad en los animales y los trabajadores, conocer el impacto económico y social de esta enfermedad, tanto en la afección de los animales como hacia quienes trabajan con ellos, contribuir a la producción de conocimiento social de esta zoonosis, capacitar a los trabajadores sobre los peligros de exposición en sus tareas laborales e implementar con ellos medidas de prevención y promoción en salud.

Contribuimos, en paralelo, al estudio de prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en perros, y de análisis serológico, cultivo y examen molecular de patógenos específicos en pinnípedos en libertad en Uruguay. El objetivo de este estudio fue hacer un relevamiento de patógenos reconocidos en lobos y leones marinos en libertad en Uruguay. Se hicieron pruebas para identificar infecciones por *Leptospira spp*, virus del moquillo canino, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Mycobacterium spp*.

Materiales y métodos

Trabajo inicial: puesta a punto de la MAT, primeros ensayos de IFI, análisis de los primeros sueros humanos y estudio local de la epidemiología de la enfermedad

Para instalar nuestro servicio de diagnóstico de base y cumplir con los objetivos de nuestro proyecto inicial de investigación se definieron las características epidemiológicas y clínicas de un caso presuntivo de leptospirosis de acuerdo a la experiencia local (Braselli, Savio y Purtscher, 1998) y la bibliografía internacional. Se diseñó el formulario de recolección de datos clínicos y epidemiológicos para acompañar el envío y recepción de muestras y se diseñaron los instructivos para la toma y el envío de muestras. Además, se puso a punto la técnica MAT con cepas cedidas por instituciones que la practicaban, se ensayó una prueba de inmunofluorescencia (luego modificada para ensayo extenso formal) y se estableció conexión con múltiples instituciones públicas y privadas interesadas, entre ellas, varias que antes enviaban los sueros humanos para que fueran estudiados en la Dirección de Laboratorios Veterinarios.

El test de chi cuadrado se empleó para excluir la independencia entre dos variables cuando se examinaron los resultados clínicos y de evolución. Los análisis estadísticos se hicieron con el *software* Epi Info para Windows. Para confirmación diagnóstica en todo el período, se estudiaron sueros pareados (fases aguda y convaleciente, tomado entre quince y veinte días después del primer suero) de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis derivados por médicos de servicios públicos y privados de atención de salud.

Las reacciones MAT se realizaron de acuerdo a la técnica estándar de dos etapas (Faine *et al.*, 2000; Haake y Levett, 2015; Hem *et al.*, 2016).

La primera etapa de tamizaje enfrentó 100 µl de una dilución 1/25 de cada suero con 100 µl de cada uno de los cultivos de *Leptospira* seleccionados (Australis Australis, Australis Bratislava, Autumnalis Autumnalis, Autumnalis Butembo, Ballum Castellonis, Canicola Canicola, Cynopteri Cynopteri, Grippotyphosa Grippotyphosa, Hebdomadis Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae, Mini Mini, Pomona Pomona, Pomona Kennewicki, Pyrogenes Pyrogenes; Sejroe Hardjo; Sejroe Wolffi; Semarang Patoc; Tarassovi Tarassovi). Fueron positivos los sueros que, observados con el microscopio de campo oscuro, mostraban menos de 50% de las leptospiras libres, sin aglutinar, de una o más variantes. Sueros positivos y negativos conocidos fueron incluidos como controles en cada placa.

La segunda etapa consistió en enfrentar diluciones seriadas de los sueros con los serovares que dieron resultado positivo en la prueba de tamizaje. El título se definió como el inverso de la última dilución que mostró resultado positivo. Un título de cuatrocientos o más para uno o más serovares en el suero de fase aguda o el de fase convaleciente o un aumento de cuatro veces entre el título de la primera y segunda muestra se consideraron como caso confirmado de infección por *Leptospira*.

Un suero que mostró títulos de doscientos para un serovar o de cien para varios serovares se informó como sugestivo de infección; si la segunda o tercera muestra de suero de ese paciente tuvo resultados similares se interpretó como una infección pasada, o posible efecto de reacciones cruzadas.

Estos criterios y puntos de corte se establecieron mediante estudio comparativo de dos grupos de personas: uno supuestamente normal, de donantes de sangre, y otro de trabajadores en riesgo de una planta de tratamiento de efluentes de OSE y del sector lácteo.

Para la IFI ensayada en nuestro proyecto inicial se utilizaron láminas adecuadas con hoyos de origen comercial (Multi-Spot, Thermo Scientific®) y se siguió con adaptaciones el procedimiento descrito por Torton, Shenberg y Van der Hoeden (1966). Las láminas se sensibilizaron con una mezcla de cultivos frescos (de entre 7 a 8 días, con 10^7 bacterias/ml aproximadamente) pertenecientes a los siguientes serovares: Pyrogenes, Bratislava, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Luego de fijarlas y secarlas, a cada hoyo se agregaron 35 µl de una dilución 1/100 del suero a ensayar. Se incubaron a 37°C por 30 minutos y luego se lavaron dos veces con *buffer* fosfato salino (PBS) 1X pH 7,2. A cada hoyo se agregaron luego 3,5 µl de una dilución 1/1000 del conjugado comercial anti-Ig humanas totales marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®, St Louis MO 63103, USA) y las láminas se incubaron a 37°C por 30 minutos. En cada lámina se incluyeron como controles sueros positivos y negativos conocidos. Para la lectura se usó un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse®).

Los ensayos de IFI se practicaron en 570 primeras —o únicas— muestras de pacientes examinados. La sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo del método fueron determinados por comparación con los resultados obtenidos en paralelo por MAT (Schelotto *et al.*, 2012). También se obtuvieron, en esta serie, muestras de sangre para cultivo en 136 pacientes y de orina en 28. Se recogieron datos clínicos y epidemiológicos de todos los pacientes.

El proyecto de comienzo presentado a la Comisión Sectorial de Investigación Científica fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, y cada paciente firmó un consentimiento informado.

Ensayo de la técnica de IFI-IgM de «preparación local» empleada luego en sucesivos programas de estudio

Las cepas de *Leptospira* (Australis Bratislava, Ballum Castellonis, Icterohaemorrhagiae Copenhageni y Canicola Canicola) utilizadas para sensibilizar las láminas de inmunofluorescencia (Multi-Spot, Thermo Scientific®) fueron seleccionadas en función de los serovares que suelen dar títulos altos en las reacciones de MAT en nuestro laboratorio.

El procedimiento de sensibilización fue idéntico al descrito más arriba. Para la detección de IgM se agregaron en cada hoyo 20 µl de una dilución 1/50 de cada suero a ensayar y las láminas se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Luego se lavaron 3 veces con agitación y, para el revelado, en cada hoyo se colocaron 20 µl de una dilución 1/15 del conjugado comercial anti-IgM humana obtenido en cabra y marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®, St Louis MO 63103, Estados Unidos). En cada lámina se incorporaron sueros positivos y negativos conocidos como controles. Para la lectura se usó un microscopio de epifluorescencia Nikon® ECLIPSE 80i, con filtro de 495nm (Meny *et al.*, 2014). La sensibilidad y especificidad de la IFI-IgM de diseño local versus MAT se establecieron utilizando una tabla de doble entrada. Para calcular el valor predictivo positivo (VPP) de la IF-IgM se utilizó el teorema de Bayes a partir de una prevalencia anual estimada de 15 casos de infección por cada 100.000 habitantes. El grado de concordancia de los resultados obtenidos por dos observadores diferentes (PM, GV) se evaluó utilizando el test de Kappa.

Evaluación de un test inmunocromatográfico comercial para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira*

Para valorar la prueba inmunocromatográfica comercial (Aria-*Leptospira* IgG/IgM COMBO RAPID TEST®) se estudiaron 60 sueros de pacientes obtenidos en etapa temprana: 30 con infección aguda por *Leptospira* confirmada por el resultado de MAT (primera muestra negativa, segunda positiva) y 30 sin infección documentada por MAT (primera y segunda muestras negativas, la segunda obtenida entre quince y veinte días después de la primera) (Iglesias *et al.*, 2018).

Evaluación de la PCR en tiempo real como técnica diagnóstica

Entre enero de 2012 y abril de 2013 se estudiaron por MAT y qPCR 235 muestras de suero de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis que fueron enviadas a nuestro laboratorio. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. También se incluyeron 20 muestras de suero de pacientes con sífilis y 15 con infección aguda por el virus de hepatitis B (González *et al.*, 2013).

La MAT se aplicó a todas las muestras de suero siguiendo el procedimiento en dos etapas descrito antes y se utilizaron los mismos criterios para la interpretación de los resultados.

Se evaluó la menor carga microbiana detectable en suero, plasma o sangre.

Para la extracción de ADN de las muestras de suero se usó el kit comercial GE, illustra™. El ADN se conservó a -20°C . Una muestra de suero negativa se usó como control en todas las reacciones de extracción. Para la amplificación por qPCR con los cebadores *lipL32-45F* y *lipL32-Rb* seguimos el procedimiento descrito por Stoddard *et al.* (2009), modificado luego por Bourhy, Bremont, Zinini, Giry y Picardeau (2011). Se usaron los cebadores para el gen eucariota *rnaseP* como control interno de inhibición.

Para la amplificación y lectura se usó el equipo Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Sydney, Australia) y el protocolo fue el siguiente: activación durante 15 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de amplificación con las siguientes temperaturas y tiempos, 95°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos y 72°C por 20 segundos. En cada reacción se incluyeron controles positivos y negativos.

Cultivo de *Leptospira* a partir de muestras humanas y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR:¹ amplificación al azar de ADN polimórfico

Muestras clínicas y cultivos para aislamiento

Se partió de 73 muestras clínicas recibidas en el laboratorio desde setiembre 2003 hasta octubre 2004. Estas consistían en suero y sangre, a veces acompañadas de orina o LCR. Correspondían a pacientes usuarios de la Administración de Servicios de Salud del Estado (ASSE) y de mutualistas de Montevideo y el interior. El suero de los pacientes fue usado para diagnóstico por MAT y la sangre —con anticoagulante—, así como la orina y el líquido cefalorraquídeo, se usaron en estudios de aislamiento de *Leptospira*. Se inculó en diferentes medios de cultivo.

La muestra de sangre de cada paciente extraída durante el período febril leptospirémico se sembró con volúmenes de 50, 100 y 150 μ l en tres tubos con 5 ml de medio de cultivo semisólido Fletcher enriquecido con suero de conejo. Se incubó en estufa entre 28°C y 30°C, durante un período de seis meses (Weyant, Bragg y Kaufmann, 2002).

Se exploró el crecimiento por microscopía de campo oscuro cada siete días durante las primeras cinco semanas y dos veces al mes durante seis meses antes de diagnosticar el cultivo como negativo.

Cuando se detectó crecimiento y el cultivo no estaba contaminado, se llevó a cabo un repique a medio Fletcher enriquecido con piruvato (0,09g de piruvato de sodio por litro) en el cual las leptospiras se pudieron mantener viables hasta por dos meses (Weyant *et al.*, 2002).

Las muestras de orina (n=3) llegaron al laboratorio refrigeradas (4°C a 8°C). Cuando fue necesario, se corrigió el pH antes de sembrarlas mediante una dilución 1/10 en PBS estéril. Se sembraron igual que los hemocultivos. Se controló el crecimiento de *Leptospira* por microscopía de campo oscuro (Haake y Levett, 2015).

El LCR (n=1) se envió al laboratorio en condiciones asépticas sin el agregado de conservadores. Se protegió de la luz solar y se mantuvo refrigerado hasta el momento de la inoculación. Se sembraron 0,25 ml en dos tubos, uno con medio de cultivo semisólido Fletcher y otro con el agregado de neomicina (un disco de 30 μ g cada 5 ml de cultivo) (Haake y Levett, 2015). No se llevaron a cabo sus diluciones. Se incubó a 28-30°C y se examinó el crecimiento por microscopía de campo oscuro como es habitual. En los casos en los que se detectó crecimiento en un cultivo contaminado o cuando se sospechó que la muestra clínica para aislamiento llegaba al laboratorio contaminada

1 Ifran, 2006.

se utilizaron caldos de cultivo selectivos, como Stuart o EMJH con el agregado de agentes, como neomicina o 5-fluorouracilo (200 µg/ml). Como etapa complementaria de purificación se filtraron cultivos contaminados desde el medio selectivo a un medio de enriquecimiento no selectivo utilizando filtros de membrana de 0,22 µm de poro.

Como alternativa de purificación de cultivos contaminados o para revitalizarlos y mantener su virulencia, se practicó la inoculación intraperitoneal de 1 ml en cobayos. Las leptospiras migran más rápidamente que otras bacterias desde la cavidad peritoneal a la sangre, de donde se recuperan entre veinte minutos y una hora más tarde por punción intracardíaca.

Caracterización genética de los aislamientos mediante RAPD-PCR

El ADN fue liberado por dos diferentes métodos. El primero supuso la extracción y purificación de ADN según un protocolo basado en el empleo de la mezcla fenol neutro:cloroformo:alcohol isoamílico, modificado para aplicación a *Leptospira*. El segundo, la extracción mediante ebullición a 100 °C, método empleado con anterioridad en el laboratorio para otros microorganismos, con ligeras variantes (Betancor *et al.*, 2004).

Para la amplificación al azar se emplearon cuatro cebadores ensayados antes, con las siguientes secuencias en dirección 5'a 3': *Primer* 23L: (CCGAAGCTGC); *Primer* OPA-4: (AATCGGGCTG); *Primer* OPB-15: (CCAGGGTGTT), y *Primer* OPB-17: (AGGGAACGAG).

Se trabajó en termociclador Hybaid (Ashford, United Kingdom) utilizando el siguiente programa: 4 ciclos a 94 °C por 4 minutos, a 35 °C por 4 minutos y a 72 °C por 4 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, a 35 °C por 1 minuto, a 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. La temperatura final del termociclador para mantenimiento de la muestra fue de 4 °C.

Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Los patrones de bandas de los aislamientos se compararon con los de cepas de referencia examinados con el mismo procedimiento (Betancor *et al.*, 2004).

Evaluación de otros métodos de laboratorio (macroaglutinación y ELISA) para el diagnóstico de leptospirosis humana

Se analizaron por macroaglutinación —técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente TR— y por ELISA (Geymonat, 2011) sueros de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis, que llegaron enviados para diagnóstico al Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina (Udelar). Se analizaron 298 primeras muestras: 127 fueron positivas también por MAT en primera o segunda muestra y 171 tuvieron doble MAT negativa. Por ELISA se ensayaron 44 primeros sueros de pares que fueron negativos en primera muestra examinada por MAT y luego positivos (20) o negativos (24) en segundo suero ensayado por MAT. El procedimiento que se siguió para la realización de la MAT fue el ya descrito.

Técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente

Para la obtención del antígeno se utilizaron las cepas de *L. interrogans* con circulación regional pertenecientes a los serovares Pomona Pomona, Pyrogenes Pyrogenes, Australis Bratislava, Canicola Canicola e Icterohaemorrhagiae Copenhageni. Los cultivos se mezclaron en pool, que se inactivó con formol al 0,2 %, se lavó repetidas veces con PBS, se calentó a 100 °C por treinta minutos, se suplementó con Tween 80 (0,1 mg/ml) y se guardó en heladera a 4 °C. Para la prueba de macroaglutinación se mezclaron partes iguales (30 µl) del antígeno (homogeneizado con anterioridad por agitación vigorosa) con el suero del paciente sobre una placa de vidrio cuadrículado. La lectura se tomó a simple vista dentro de los cuatro minutos. La formación de grumos gruesos se interpretó como resultado positivo. En cada ensayo se incluyó un suero control positivo, uno control negativo y un control de la suspensión antigénica. Se ensayaron sueros de pacientes con otras enfermedades para descartar reacciones cruzadas.

Ensayo de un método de ELISA

Para la obtención del antígeno *crudo* como reactivo de captura se utilizaron cepas de *L. interrogans* de los serovares Australis Bratislava, Icterohaemorrhagiae Copenhageni, Sejroe Hardjo prajitno, Ballum Castellonis, Pyrogenes Pyrogenes y Pomona Pomona. Cada una fue cultivada individualmente en medio EMJH a 28 °C durante 20 a 25 días hasta alcanzar una concentración de 5×10^9 cel/ml. Se conservaron a -20 °C durante 7 días y luego se cumplieron tres pasos de centrifugación a 10.000 g durante treinta minutos y lavados con PBS 0,02 M pH 7,2. Luego se hizo la lisis celular por sonicación (pulsos

de 20 KHz por tres minutos, en hielo). La concentración proteica de cada antígeno se determinó usando el método del ácido bicinonínico (SIGMA™). Se preparó un *pool* homogéneo de antígenos y se estableció por ensayo la concentración de proteínas totales de 7 µg/ml como la óptima para diferenciar entre sueros negativos y positivos conocidos.

Las placas de ELISA con 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp de NUNC™) se sensibilizaron con 100 µl de antígeno y se dejaron en incubación por 24 horas a 4 °C. Se llevaron a cabo seis lavados con PBS-Tween 20 (0,05 %) y después se las bloqueó con 200 µl de PBS-Tween con 5 % de leche descremada. Se incubaron por una hora a 37 °C y se lavaron seis veces más. Se diluyeron los sueros de los pacientes 1:5000 en tampón de incubación (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,3, 2 % BSA). Se colocaron 100 µl de dichas diluciones en cada pocillo, se incubaron por treinta minutos a 37 °C y se ejecutaron seis lavados. Se agregaron 100 µL de un anticuerpo de cabra anti-IgG+IgA+IgM humanas conjugado a peroxidasa (INVITROGEN™) diluido 1:5000 en tampón de incubación. Se incubaron por treinta minutos a 37 °C y se lavaron seis veces. Se agregaron 100 µl de sustrato cromogénico (OPD), se incubó por quince minutos a 37 °C en oscuridad y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2N. Se tomó la lectura en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm. En cada ensayo se analizaron paralelamente un control positivo, uno negativo y sueros positivos para otras enfermedades.

Para determinar con intervalo de confianza 95 % la sensibilidad, especificidad y demás parámetros de la prueba de aglutinación y el ensayo de ELISA se utilizó el software de procesamiento de datos tabulados EPIDAT 3.1, de libre distribución. Para calcular el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) se aplicó el teorema de Bayes.

Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo, en el cual se evaluaron los conocimientos de médicos y veterinarios sobre leptospirosis humana (Berois, Jeldres, Lara y Leites, 2015).

Los datos obtenidos derivaron de una fuente primaria mediante un cuestionario elaborado en el programa Form Designer de Epi Info 7TM que los participantes contestaron a través de una entrevista telefónica. Se enviaron previamente por vía electrónica los consentimientos informados, que se debían responder de modo afirmativo en caso de acceder a participar en el estudio.

Los datos se registraron en medio electrónico con el programa Enter, y el análisis se practicó con Classic Analysis, correlacionando las respuestas con las que se consideraron correctas y comparando lo expresado entre profesionales médicos y veterinarios. Para esto, se hizo una selección representativa de la población de profesionales registrada en los padrones nacionales, previa carta de solicitud y aprobación de las pertinentes autoridades.

Mediante muestreo aleatorio simple, utilizando una lista de números randomizados generada por la función Math.random, obtenida con el programa OpenEpi, Versión 3, se seleccionó un grupo de 385 profesionales médicos del área humana y otro de 385 profesionales veterinarios.

El tamaño muestral se calculó utilizando el *software* Sample Size Calculator: Comparing Two Proportions, disponible en línea.² Se previó un nivel de significación de 95%, una potencia de 80% y una proporción esperable en las variables a evaluar de 50% de respuestas correctas en ambos grupos.

Las variables registradas fueron departamento de trabajo; profesión, especialidad y antigüedad; edad, y conocimientos sobre incidencia, mortalidad, población afectada, ocupación de infectados, reservorio, forma de transmisión, presentación clínica, síntomas, diagnóstico y criterios de prevención relacionados a la leptospirosis humana.

Se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión para variables cuantitativas, mientras que las variables cualitativas se expresaron en porcentajes. Las comparaciones de datos numéricos entre los dos grupos se hicieron con la prueba de t de Student para muestras independientes y las comparaciones de variables cualitativas se llevaron a cabo mediante el test de chi cuadrado.

A fin de mantener la confidencialidad de los datos, toda información proporcionada por los sujetos de investigación fue anonimizada irreversiblemente y utilizada solo con fines académicos.

2 <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>

Caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental

Las cepas estudiadas se recuperaron entre enero de 2010 y diciembre de 2016. Para la extracción de ADN se cultivaron en medio líquido EMJH hasta que alcanzaron una concentración aproximada de 10⁸ bacterias/ml. Se usó el kit comercial de extracción Dneasy Blood & Tissue® (Qiagen®, Germany). El ADN obtenido se conservó a -20°C hasta su uso en las diferentes reacciones de PCR (Meny *et al.*, 2017).

Para la identificación inicial se hicieron reacciones de amplificación por PCR para dos genes, el que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal que está presente en todas las leptospiras y el que codifica para la proteína LipL32, que solo se encuentra en las cepas definidas como patogénicas. Para separar *L. biflexa* de otras cepas saprófitas se realizó otra reacción de PCR dirigida al gen 23S. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz uv mediante el sistema FOTO/Analyst Investigator Eclipse Fotodyne® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y las imágenes obtenidas se conservaron en formato electrónico.

Identificación a nivel de especie por secuenciación parcial del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal

Se usaron los cebadores Lepto A y Lepto B para amplificar un fragmento de 330 pares de bases del gen 16S. Los productos de PCR purificados se utilizaron como molde junto con los cebadores internos Lepto C y S4 para la secuenciación. Los resultados obtenidos se compararon usando la herramienta Nucleotide BLAST³ con secuencias de especies de *Leptospira* conocidas depositadas en la base de datos GenBank (Postic, Riquelme Sertour, Merien, Perolat y Baranton, 2000).

3 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Análisis por MLVA (MultiLocus Variable-number of tandem repeats (VNTR Analysis))

Los aislamientos humanos con resultado positivo para los genes *i6S* y *lipL32* (patogénicos) se analizaron por el procedimiento de MLVA-VNTR descrito por Salaün *et al.* (2006). Se usaron tres pares de cebadores para amplificar y determinar el número de repeticiones presentes en tres loci diferentes, VNTR 4, VNTR 7 y VNTR 10, que permiten caracterizar cepas de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaün, Mérien, Gurianova, Baranton y Picardeu, 2006). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en agarosa, se determinó el tamaño de cada amplicón y se calculó el número de repeticiones para cada uno. Los resultados se compararon a través de tablas con los conocidos para diferentes cepas.

Estudio mediante Multilocus Sequence Typing

La técnica MLST se aplicó sobre dos aislamientos humanos, siguiendo un procedimiento ya descrito (Boonsilp *et al.*, 2013). Se amplificaron fragmentos internos de los siete genes *house keeping* ya mencionados, que luego se secuenciaron usando la plataforma RPTOIA-PDTIS/FIOCRUZ DNA.⁴ Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas para determinar el perfil alélico y el secuenciotipo utilizando el programa MAFFT.⁵

Electroforesis en campos pulsantes

El procedimiento de PFGE se aplicó sobre los dos aislamientos humanos estudiados por MLST. Se siguió la técnica ya descrita (Galloway y Levett, 2010). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una densidad óptica de 1.4 con una longitud de onda de 610 nm. Se mezclaron con el mismo volumen de una solución al 1,2 % de agarosa grado certificado PFGE (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) precalentada y mantenida a 55 °C. Las suspensiones se colocaron en moldes adecuados y se dejaron solidificar. Los bloques se lavaron, se cortaron del tamaño recomendado y se digirieron por dos horas a 37 °C con la enzima de restricción *NotI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE.UU.). Los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa usando el sistema CHEF DR-II (Bio-Rad®). Bloques con ADN de *Salmonella enterica* serotipo Braenderup (CDCH9812), digeridos con la enzima *XbaI*, se incluyeron como estándar de tamaños. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz UV usando el sistema

4 <http://plataformas.cdts.fiocruz.br/>

5 www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

FOTO/Analyst Investigator Eclipse Fotodyne® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se conservaron las imágenes obtenidas. La comparación de los patrones de bandas se hizo a simple vista.

Seroprevalencia de leptospirosis en grupos humanos en riesgo debido a factores ambientales, laborales o sociales

Para estudiar la seroprevalencia de la infección por *Leptospira* en diferentes grupos humanos en riesgo, la identificación de zonas del país y grupos humanos con riesgo de infectarse con *Leptospira* se basó en datos obtenidos en nuestro laboratorio a partir de las fichas de notificación que acompañan, en general, las muestras para diagnóstico (Meny *et al.*, 2019).

Los lugares y las personas fueron visitados por integrantes del equipo. La participación en el estudio fue voluntaria. Teniendo en cuenta una seroprevalencia esperada de 50% en poblaciones en riesgo, se calculó una muestra de trescientas personas. Entre abril de 2015 y abril de 2017 se estudiaron 308 personas (trescientas con factores de riesgo y ocho sin ellos), entre ellas, trabajadores de arrozales en Treinta y Tres, Rocha y Lavalleja (doce visitas); tamberos de Florida, Colonia y Río Negro (cuatro visitas); habitantes de asentamientos con actividades informales de reciclado y crianza de animales en Montevideo y Canelones (tres lugares, nueve visitas), y trabajadores temporarios en plantas de reciclado en Montevideo (cuatro lugares, cinco visitas). Se organizaron además cinco reuniones en San José, Durazno, Salto, Tacuarembó y Treinta y Tres para difundir información sobre el agente y la enfermedad. Las visitas y reuniones se aprovecharon para obtener muestras de trabajadores, pobladores, profesionales y otros. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República y cada participante firmó previamente un consentimiento informado. A su vez, cada uno respondió un cuestionario para evaluar la presencia de factores de riesgo y las condiciones de trabajo.

Recolección de muestras y procedimientos de laboratorio

Muestras humanas, animales y ambientales

La sangre de los 308 voluntarios se obtuvo por punción venosa y se colocó en tubos con acelerador para separar rápidamente el suero. Cada suero se estudió por MAT y por IFI-IgM, como ya se describió. Se obtuvo también sangre de cincuenta perros y veintidós caballos que estaban en contacto estrecho con trabajadores de arrozales, tambos y con personas que habitaban asentamientos. Las muestras de los animales se obtuvieron siguiendo las recomendaciones ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo Experiments*).

La presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* se estableció por la técnica de MAT. Cultivos de los serovares Ballum Castellonis, Autumnalis Butembo, Cynopteri Cynopteri, Canicola Canicola, Grippotyphosa Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae, Pomona Pomona y Pyrogenes Pyrogenes se usaron como antígenos en la MAT para perros; Ballum Castellonis, Canicola Canicola, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa Grippotyphosa, Pomona Pomona, Sejroe Hardjo, Sejroe Hardjo bovis, Sejroe Wolffi y Tarassovi Tarassovi para muestras de caballos. Un título mayor o igual a 100 se consideró como indicador de infección (actual o pasada) en estos animales (Grüne Löffler, Martínez, Romero y Brihuega, 2014). También se tomaron muestras de cuerpos de agua próximos a los hogares y lugares de trabajo de las personas que participaron en el estudio (diez muestras de campos de arroz, nueve de cuatro tambos y seis de tres asentamientos). Las muestras se recogieron en recipientes estériles y se transportaron al laboratorio refrigeradas (entre 4°C y 8°C). Luego de agitarlas vigorosamente, se pasaron por filtro de 0,22 µm. De cada filtrado se sembraron 500 µl en medio semisólido Fletcher y otros 500 µl en medio líquido EMJH (Difco-BD®). Los medios se incubaron a 28°C y se observaron con periodicidad en campo oscuro para evidenciar crecimiento. Los cultivos recuperados fueron estudiados por procedimientos convencionales ya descritos (Pinto *et al.*, 2017).

Cuestionarios personales de relevamiento

A todos los trabajadores estudiados se les tomaron datos personales para determinar la presencia de factores de riesgo conocidos para infección por *Leptospira*. Se indagó sobre condiciones laborales, contacto con agua potencialmente contaminada, con animales y otros. Se les dio información verbal y en folleto impreso sobre la enfermedad, las circunstancias de riesgo, las medidas preventivas recomendadas.

Se usaron el paquete *spss* y el software Epi-Info 2000 para llevar a cabo un análisis univariado inicial con las medidas de resumen apropiadas para variables cualitativas y cuantitativas. Se exploraron asociaciones estadísticas entre variables potencialmente dependientes y se emplearon los tests de chi cuadrado o exacto de Fisher para excluir la independencia entre variables con p menor a 0,05. Finalmente, se empleó la técnica de regresión logística para el análisis multivariado que permitió seleccionar los factores que explicaban la serorreactividad.

Reservorio vacuno

Para estudiar detalles del reservorio vacuno de *Leptospira* se contribuyó de modo esporádico al diagnóstico por MAT de infecciones en rodeos bovinos, con muestras enviadas por profesionales del área pública y de la privada, y se procesaron muestras de relevamientos epidemiológicos organizados con más de setecientos sueros (Puentes *et al.*, 2011). Además, se procuró el aislamiento y la identificación de las cepas involucradas en infecciones bovinas, fueran estas agudas o crónicas.

Desde 2014 hasta 2018 se obtuvieron 437 muestras de orina tomadas con asepsia por punción vesical y 612 riñones en la línea de faena de 22 mataderos que recibieron animales de distintas zonas del país. Los riñones y la orina no correspondieron a los mismos animales, por lo que se los consideró independientes. Se estudiaron en el laboratorio, además, muestras de orina y de órganos bovinos tomadas por nuestro equipo o enviadas ya sembradas por veterinarios de campo, procedentes de 166 rodeos con sospecha o diagnóstico previo de infección por *Leptospira* —con un mínimo de cinco muestras por rodeo—. Nuestras visitas incluyeron la toma ocasional de muestras de agua ambiental, que fueron cultivadas y examinadas como ya fue explicado.

Las muestras de orina (100 µl) se sembraron *in situ* en medio líquido EMJH con el agregado de 5-fluorouracilo (EMJH-5FU). En el laboratorio se hicieron subcultivos 1/10 y 1/100 de cada tubo original en el mismo medio y se incubaron en conjunto.

Los riñones se transportaron refrigerados al laboratorio y se procesaron dentro de las seis primeras horas de recibidos. De cada uno se tomó, de forma estéril y en cabina de seguridad biológica, un fragmento de aproximadamente 10 g y se colocó en una bolsa para *stomacher*. Se agregaron 10 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril y se procesaron en el masticador hasta obtener una suspensión homogénea. La mezcla se dejó asentar por quince minutos y luego 250 µl del sobrenadante se sembraron en 5 ml de EMJH-5FU (tubo A). Se colocaron 500 µl del tubo A en un segundo tubo

con 5 ml de EMJH-5FU (tubo B). Un fragmento cilíndrico de cada riñón obtenido por punción con pipeta Pasteur de vidrio estéril se sembró directamente en 5ml de medio Fletcher.

Los medios sembrados con muestras de riñones y orina se incubaron a 28 °C y se observaron periódicamente en campo oscuro para evidenciar crecimiento. Se purificaron por los procedimientos ya descritos y se identificaron con las técnicas ya mencionadas de PCR, secuenciación parcial de genes microbianos y MLVA-VNTR. Con colaboración y sueros del IPMONT se completó la clasificación en serogrupos por técnica de MAT inversa.

Para evaluar la presencia y difusión de la leptospirosis en equinos y referentes humanos se tomaron muestras de sangre yugular (aproximadamente 10ml) de 880 equinos de grupos representativos de su distribución en el país hasta agosto de 2020.

Se estudiaron haras de cría y entrenamiento, *studs* de finalidad deportiva, predios de trabajo agropecuario, frigoríficos de faena para consumo y exportación y Veterinaria y Remonta del Ejército. Se examinaron las condiciones ambientales en cada sitio; se establecieron nexos de intercambio e información oral y escrita con responsables a cargo de los animales, y se tomaron 150 muestras de sangre a personas para estudiar la eventual relación de la infección equina con la de referentes humanos en contacto próximo con los animales. De las personas en contacto se obtuvieron consentimientos informados y cuestionarios de relevamiento sobre factores de riesgo de infección, similares a los empleados antes en el estudio comparativo de grupos sociales vulnerables. En planilla se consignaron datos referidos al manejo y estado sanitario de los equinos en las distintas localizaciones se registraron la entrada de nuevos animales, la cría, la alimentación, la monta natural o la inseminación artificial, la presencia de otras especies domésticas o de producción, el control de animales silvestres, los antecedentes de trastornos reproductivos y de otras patologías vinculables con la leptospirosis.

Los sueros equinos se estudiaron con MAT, como fue ya explicado, y los humanos con MAT e IFI-IgM. Cuando los títulos equinos fueron iguales o superiores a 200, se procuró volver y recuperar muestras de orina animal por micción espontánea para aislar e identificar cepas infectantes, según metodología ya mencionada.

Los resultados, la información y su análisis estadístico se asentaron con los procedimientos ya empleados en la elaboración de los datos del programa de estudio de poblaciones en riesgo.

Otros componentes del reservorio animal

En el período considerado estudiaron, además, por MAT, 140 sueros de perros vinculados a poblaciones vulnerables, 123 sueros de pinnípedos, lobos y leones marinos muestreados por veterinarios de la Universidad de la República en la Isla de Lobos y el Cabo Polonio, 109 sueros de ratas capturadas por nuestro equipo o por profesionales colaboradores y muestras ocasionales de ratones, jabalíes, nutrias, alpacas u otros animales.

Para los roedores se emplearon trampas Sherman y Tomahawk que se colocaron en varios lugares de Montevideo y de Canelones con cebo apropiado. Entre estos lugares había sitios de disposición de residuos, cementerios, locales de cría de diversos animales y depósitos de alimentos.

Las ratas capturadas fueron sedadas con éter, anestesiadas con mezcla ketamina-xylacina y, luego, sexadas, medidas, pesadas y clasificadas en especies antes de la toma de muestras. La toma de sangre se hizo por punción cardíaca y la eutanasia se cumplió con sobredosis de barbitúricos por vía intraperitoneal. Cumplida la disección con técnica aséptica, se tomaron muestras de orina por punción vesical, que se sembraron *in situ*, y de riñones para procesamiento en el laboratorio con cultivo y PCR, de modo similar a lo descrito para bovinos.

Se trabajó con equipo completo de protección personal, y los residuos biológicos se desecharon de manera segura según la normativa del laboratorio y se entregaron, siempre que fue posible, los ejemplares estudiados sumergidos en formol al Museo de Historia Natural para su colección.

Para cada uno de los subprogramas de estudios del reservorio se contó con protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y con técnicos acreditados por ella.

Resultados

Trabajo inicial: puesta a punto de la MAT, primeros ensayos de IFI, análisis de los primeros sueros humanos y estudio local de la epidemiología de la enfermedad

Entre diciembre de 2000 y diciembre de 2010 se estudiaron sueros de 6778 pacientes, se hicieron más de 10.000 ensayos de MAT y se recuperaron 3 cepas de *Leptospira*, aunque solo una estuvo disponible para estudios posteriores. Se confirmaron 945 infecciones por MAT. El número fue variable a lo largo de los años, con picos en 2002, 2003, 2007 y 2010, que coincidieron con inundaciones que afectaron diferentes zonas del país (tabla 1). Asimismo, los casos predominaron en los meses más lluviosos del año —final del verano, otoño y primavera (figura 5)—. Estos patrones de distribución se mantuvieron en la segunda década.

AÑO	NÚMERO DE CASOS	NÚMERO DE MUERTES
2000	23	5
2001	58	7
2002	155	2
2003	118	6
2004	45	2
2005	89	3
2006	60	0
2007	138	2
2008	62	0
2009	43	0
2010	154	1
TOTAL	945	28

Tabla 1. Casos de leptospirosis anuales confirmados por MAT y muertes reportadas en Uruguay (2000-2010).

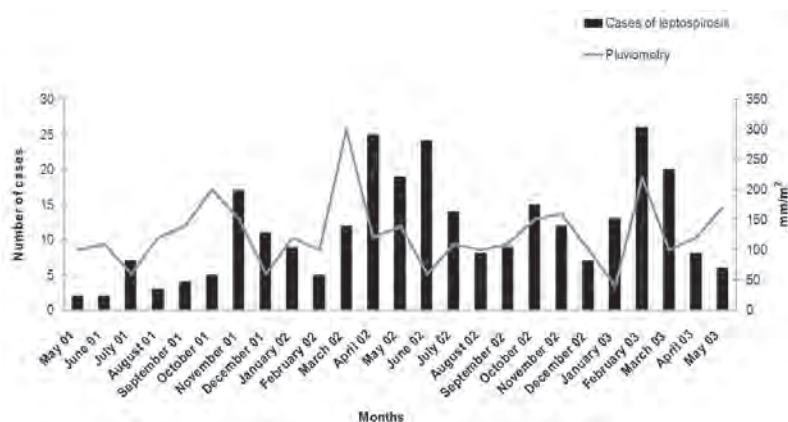


Figura 5. Número mensual de casos de leptospirosis en relación con las precipitaciones. Mayo de 2001-mayo de 2003.

Fuente: Schelotto *et al.* (2012).

La gran mayoría de los individuos con infección confirmada por *Leptospira* vivía fuera del departamento de Montevideo, aunque casi la mitad de la población total del país viva allí. Los departamentos donde se concentran las actividades de lechería (Florida y Colonia) mostraron las mayores tasas de infección.

La proporción de casos urbanos fue relativamente mayor durante los años de menor incidencia general (19,5 % en Montevideo en 2004-2005). Los hombres representaron más del 93 % de los casos confirmados; el 50 % fueron trabajadores con edades entre veinte y cuarenta años (figura 6).

Las actividades rurales que desarrolla el 57 % de las personas infectadas eran, entre otras, la producción lechera, la ganadería bovina y ovina, la agricultura, el cultivo y la cosecha de arroz, la forestación y explotación forestal. El 14 % de los pacientes estuvo involucrado en otros trabajos de riesgo relacionados: faena, transporte de ganado, raciones, etc. Individuos desempleados, estudiantes, empleados de oficinas y personas que desarrollan otras actividades no enumeradas representaron una pequeña proporción de los casos infectados.

Los registros de la ocupación estuvieron disponibles en 498 pacientes positivos.

Características clínicas de los pacientes

Tuvimos acceso a los registros clínicos de 491 pacientes con infección confirmada por *Leptospira*. La tabla 2 muestra la distribución de los síntomas y signos presentes en ellos.

SÍNTOMAS Y SIGNOS	NÚMERO	(%)
FIEBRE	462	94,1
ASTENIA	422	86
MIALGIA	420	85,6
CEFALEA	398	81
FOTOFOBIA	52	10,5
NEUROLÓGICOS	21	4,2
VÓMITOS	196	40
DOLOR ABDOMINAL	147	30
ICTERICIA	133	27
HEPATOMEGALIA	52	10,5
TOS	108	22
EXPECTORACIÓN	77	15,6
DOLOR TORÁCICO	44	8,9
FALLA RENAL AGUDA Y DESÓRDENES URINARIOS	167	34
HIPEREMIA CONJUNTIVAL	162	33
PETEQUIAS	21	4,2
TOTAL	491	100

Tabla 2. Síntomas y signos de 491 casos totalmente registrados en Uruguay, período 2000-2010.

La fiebre, la astenia, las artromialgias y la cefalea estuvieron presentes entre el 80 % y el 95 % de estos pacientes. Muchos pacientes mostraron al menos una característica clínica anormal adicional. Vómitos y otros signos y síntomas abdominales o hepáticos y la hiperemia conjuntival y signos de alteración de la función renal o urinaria —hematuria, proteinuria, piuria— estuvieron presentes entre el 30 % y el 40 % de los casos confirmados. Tos u otras manifestaciones respiratorias —entre ellas, hemoptisis o dificultad respiratoria— se vieron entre el 20 % y el 30 % de los casos. La fotofobia, acompañada de dolor de cabeza, se manifestó casi el 30 % de las veces. Anormalidades neurológicas —meningitis, confusión transitoria— se observaron con escasa frecuencia (tabla 2). Proporciones similares se obtuvieron cuando se contabilizaron síntomas y signos de pacientes de Florida por separado (Filippini *et al.*, 2003).

Las formas ictericas fueron más frecuentes en pacientes mayores de 40 años. Los registros mostraron 62 casos de ictericia en un total de 304 pacientes menores de 40 años y 71 casos en 187 personas mayores (prueba de independencia de chi cuadrado=18.104, valor $p=0,00002092$). La hepatomegalia presentó una distribución similar por edades, pero las cifras fueron más bajas en total.

La mayoría de las infecciones clínicamente manifestadas presentaron un patrón agudo y lo habitual fue la recuperación completa. El número anual de muertes por leptospirosis nunca fue superior a 10: alcanzó un máximo de 7 casos notificados en 2001, 6 en 2003 y descendió a 0 en los años de baja incidencia (tabla 1). En el período 2000-2005 hubo 25 muertes en 488 pacientes y, entre 2006 y 2010, 3 muertes en 457 pacientes (prueba de independencia de chi cuadrado, corrección de Yates =14,858, valor $p=0,00011592$).

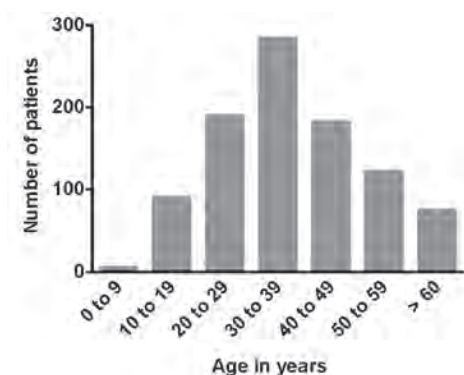


Figura 6. Edad de los pacientes con leptospirosis confirmada por MAT.
Fuente: Schelotto *et al.* (2012).

Los serovares más reactivos en MAT se muestran en la figura 7.

La sensibilidad de la IFI para anticuerpos totales en las muestras iniciales fue del 67,63% en comparación con MAT y la especificidad fue del 91,07%, con un valor predictivo positivo de 92,13%. En 40 de 78 pacientes con MAT inicial negativa y segunda positiva (infección aguda), la IFI fue positiva en la primera muestra. Esto revela el valor de este ensayo en la detección temprana.

En 70 de 285 pacientes sin resultado confirmado (sin segunda muestra para MAT), la IFI produjo una reacción positiva; 64 de ellos (22,35%) podrían haber sido confirmados con MAT completa.

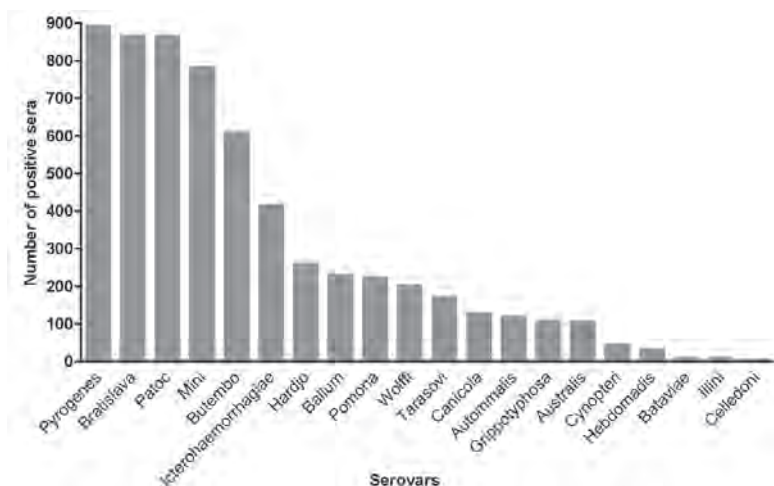


Figura 7. Serovares reactivos en MAT.
Fuente: Schelotto *et al.* (2012).

Cultivo de *Leptospira* y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR:⁶ Amplificación al azar de ADN polimórfico

En la primera tesina de grado orientada en el Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene (Ifiran, 2006), 14 de los 73 pacientes analizados (19%) mostraron resultado positivo en MAT. Solo se obtuvieron tres hemocultivos positivos y, entre ellos, se pudo mantener viable un cultivo, obtenido de un paciente del departamento de Colonia. No hubo cultivos positivos de muestras de orina ni de la única de LCR procesada.

En el suero de dos cobayos inoculados con la cepa de origen humano se observó reactividad con varios serovares de *Leptospira*. Los mayores títulos correspondieron a Australis Bratislava, Pomona Pomona, Pyrogenes Pyrogenes, Semarang Patoc y Sejroe Wolffi.

Los análisis con RAPD-PCR mostraron que todas las reacciones de amplificación produjeron bandas en el rango deseable de pesos moleculares entre 100pb y 1500pb.

Los patrones de bandas fueron considerados distintos cuando diferían en dos o más bandas.

La concentración de ADN que generó una buena intensidad de bandas y que produjo un buen perfil genético fue de 50ng. Ambos métodos de extracción y purificación de ADN (fenol neutro:cloroformo:alcohol isoamílico y

6 Ifiran (2006).

calentamiento a ebullición) produjeron perfiles genéticos similares para los serovares de *Leptospira* elegidos.

El cebador OPB-15 generó la mayor cantidad de bandas para todos los serovares de *Leptospira* elegidos en el ensayo y al igual que el cebador 23-L permitió definir un perfil idéntico entre la cepa de origen humano y la cepa del panel Pomona Pomona.

Los resultados de los ensayos de caracterización genética llevados a cabo en Australia revelaron que el perfil genético de la cepa aislada perteneciente al paciente de Juan Lacaze, Colonia era *L. interrogans* Pomona Pomona. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos por RAPD-PCR, tanto con el cebador 23-L, como con el cebador OPB-15.

La figura 8 muestra el resultado de la estandarización del procedimiento RAPD-PCR con cebador 23-L y con molde de ADN de las cepas de colección Semaranga Patoc y Australis Bratislava. Por otro lado, la figura 9 muestra los resultados de nuevos ensayos utilizando el cebador 23-L con ADN de distintos serovares seleccionados del panel mat, y con el ADN de la cepa aislada, obtenidos con la mezcla fenol neutro:cloroformo:alcohol isoamílico. A dos de ellas también se les hizo la extracción de adn por ebullición. Se incluyó una reacción de control con ADN de *Salmonella enterica*, obtenida por ebullición. A su vez, en la figura 10 se observan los resultados de la reacción RAPD-PCR con el cebador OPB-15, incluyendo ADN de todos los serovares seleccionados y de la cepa aislada.

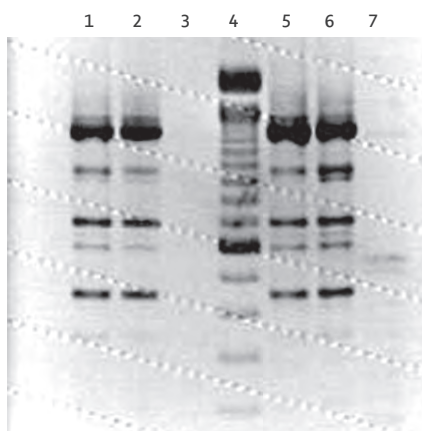


Figura 8. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN genómico (50 ng), con el cebador 23-L para los serovares Semaranga Patoc y Australis Bratislava. Carril 1: 10 ng de ADN; carril 2: 50 ng de ADN del serovar Australis Bratislava; carril 3: mezcla de reacción más 10 μ l de H₂O MQ sin ADN (control negativo); carril 4: marcador de peso molecular (100pb; Gibco); carril 5: 10 ng de ADN; carril 6: 50 ng de ADN del serovar Semaranga Patoc; carril 7: mezcla de reacción más 10 μ l de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

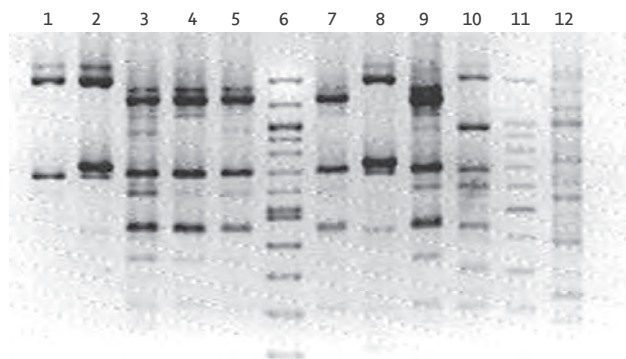


Figura 9. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN genómico (50 ng) de los serovares de colección elegidos y la cepa aislada; se utilizó cebador 23-L. Carril 1: Icterohaemorrhagiae Copenhageni; carril 2: cepa aislada; carril 3: Australis Bratislava; carril 4: Australis Bratislava (extracción 100°C); carril 5: Semaranga Patoc; carril 6: marcador de peso molecular (100pb; Gibco); carril 7: Semaranga Patoc (extracción a 100°C); carril 8: Pomona Pomona; carril 9: Pyrogenes Pyrogenes; carril 10: Sejroe Hardjo; carril 11: marcador de peso molecular (100pb; Gibco); carril 12: ADN de S. Enteritidis. carril 13: mezcla de reacción más 10µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

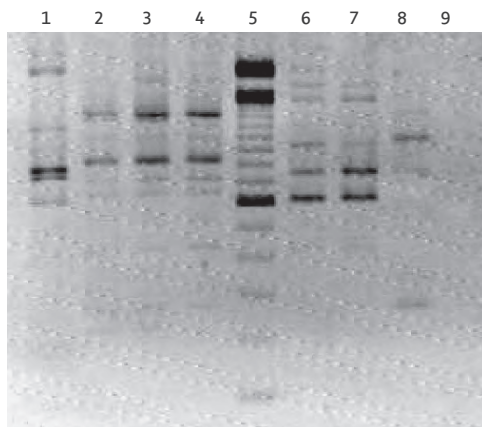


Figura 10. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN (50 ng) de los serovares de colección y la cepa aislada, con el cebador OPB-15. Carril 1: Icterohaemorrhagiae Copenhageni; carril 2: Australis Bratislava; carril 3: Semaranga Patoc; carril 4: Pyrogenes Pyrogenes; carril 5: Marcador de peso molecular (100pb; Gibco); carril 6: cepa aislada; carril 7: Pomona Pomona; carril 8: Sejroe Hardjo; carril 9: mezcla de reacción más 10µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

Los dos primeros análisis por MAT de sueros del paciente confirmado como infectado por el serovar Pomona Pomona mostraron reactividad para varios serogrupos y bajos títulos para Pomona.

Solo un tercer suero obtenido en fase convaleciente reveló un título de 800 para Pomona (tabla 3).

SEROGRUPO	SEROVAR	TÍTULO 1.A MUESTRA	TÍTULO 2.A MUESTRA	TÍTULO 3.A MUESTRA
AUSTRALIS	AUSTRALIS	NEGATIVO	50	100
AUSTRALIS	BRATISLAVA	50	400	400
AUTUMNALIS	AUTUMNALIS	NEGATIVO	NEGATIVO	50
AUTUMNALIS	BUTEMBO	NEGATIVO	100	100
BALLUM	CASTELLONIS	NEGATIVO	NEGATIVO	50
BATAVIE	BATAVIE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CANICOLA	CANICOLA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CELLEDONI	CELLEDONI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CYNOPTERI	CYNOPTERI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GRIPPOTYPHOSA	GRIPPOTYPHOSA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
HEBDOMADIS	HEBDOMADIS	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
ICTEROHEMORRAGIAE	COPENHAGENI	NEGATIVO	100	100
LEPTONEMA	ILLINI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
MINI	MINI	100	1600	800
POMONA	POMONA	NEGATIVO	100	800
PYROGENES	PYROGENES	50	400	400
SEJROE	HARDJO	100	100	100
SEJROE	SEJROE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SEJROE	WOLFI	100	NEGATIVO	100
SEMARANGA	PATOC	NEGATIVO	400	800
TARASSOVI	TARASSOVI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla 3. Resultado de la prueba MAT del paciente infectado por *L. interrogans* serogrupo Pomona, serovar Pomona.

Evaluación de la macroaglutinación y ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana

En el marco del segundo trabajo de tesina de grado orientada en el Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene (Geymonat, 2011), los resultados de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) sobre las primeras muestras recibidas para diagnóstico mostraron concordancia con la MAT en 86 muestras positivas de 127 (50 muestras ya positivas por MAT en primera muestra y 77 muestras que tuvieron un primer resultado negativo por MAT, pero una segunda muestra con resultado positivo). También hubo concordancia en 146 muestras negativas de 171 confirmadas como negativas por MAT en 2 muestras. Se consideraron 41 muestras como falsos negativos y 25 muestras como falsos positivos (tabla 3). Las comparaciones se hicieron siempre sobre pacientes con ensayo completo de 2 muestras MAT.

DIAGNÓSTICO POR MAT				
AGLUTINACIÓN ANTÍGENO TR	MACROSCÓPICA CON	INFECTADO	NO INFECTADO	TOTAL
POSITIVO		86	25	111
NEGATIVO		41	146	187
TOTAL		127	171	298

Tabla 4. Resultado comparativo entre la MAT y la técnica de aglutinación macroscópica con TR con sueros positivos por MAT.

La sensibilidad de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno TR aplicada a una primera muestra de suero fue de 67,72% (intervalo de confianza 95%: 59,19-76,24), mientras que la especificidad de la prueba fue de 85,38% (intervalo de confianza 95%: 79,79-90,97) (tabla 5).

La razón de verosimilitud para resultados positivos ($rv+$) fue de 4,63 y la razón de verosimilitud para resultados negativos ($rv-$) fue de 0,38. El índice de Youden (iy) fue de 0,53.

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,125 y el VPN fue de 0,999. Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes) el VPP fue de 0,450 y el VPN de 0,9375.

También se estimó la capacidad de la prueba de aglutinación macroscópica con TR para detectar precozmente infecciones que tuvieron primera muestra con resultado negativo por MAT y segunda muestra con resultado positivo por MAT (tabla 5). Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta

prueba fue positiva en el 58,44% de 77 pacientes cuya primera muestra por MAT fue negativa y la segunda muestra por MAT positiva.

DIAGNÓSTICO POR MAT					
AGLUTINACIÓN ANTÍGENO TR	MACROSCÓPICA	CON	INFECTADO	NO INFECTADO	TOTAL
POSITIVO			45	25	70
NEGATIVO			32	146	178
TOTAL			77	171	248

Tabla 5. Resultado comparativo entre la MAT y la técnica de aglutinación macroscópica con TR con primeros sueros negativos por MAT de pacientes que fueron positivos en segunda instancia (seroconversión, infección aguda).

Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta prueba fue positiva en el 58,44% de 77 pacientes cuya primera muestra por MAT fue negativa y la segunda muestra por MAT positiva.

La prueba de ELISA indirecta se aplicó en primera instancia al primer suero de los pacientes que tuvieron dos muestras negativas por MAT, con un intervalo entre ellas de diez a quince días aproximadamente. Esto permitió establecer el punto de corte (*cut-off*), estimado como la media de los negativos más dos desvíos estándar. La media de la absorbancia a 492nm del grupo control negativo fue de 0,25±0,15. El punto de corte estimado que permitió establecer el límite de reactividad fue de 0,55. Los sueros de pacientes positivos por MAT tuvieron una media de 1,88±0,61.

La absorbancia de los sueros de pacientes con otras enfermedades (hepatitis B y sífilis) cayó por debajo del punto de corte, con una media de 0,21±0,12. No se observó reacción cruzada con sueros de pacientes con sífilis o hepatitis B.

Los resultados de la prueba ELISA fueron coincidentes con la prueba MAT en 19 muestras positivas de 20 y en 23 muestras negativas de 24. Una muestra positiva no fue detectada por el ELISA y una muestra fue considerada como falso positivo (tabla 6).

DIAGNÓSTICO POR MAT			
ELISA	INFECTADO	NO INFECTADO	TOTAL
POSITIVO	19	1	20
NEGATIVO	1	23	24
TOTAL	20	24	44

Tabla 6. Resultado comparativo de las pruebas de ELISA y MAT.

La sensibilidad de la prueba ELISA fue de 95% (intervalo de confianza 95%: 82,95-100), mientras que la especificidad de la prueba fue 95,83% (intervalo de confianza 95%: 85,76-100).

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,412 y el VPN fue de 0,99. Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes), el VPP fue de 0,8008 y el VPN fue de 0,9908.

Evaluación de otros procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infección por *Leptospira*

En el programa de evaluación del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para IgM específica, de los 161 sueros analizados por IFI-IgM, 97 correspondieron a pacientes con infección aguda y 64 a personas sin infección. De los 97, 51 mostraron resultados negativos por MAT en la primera muestra y en 46 el título de la primera muestra fue mayor o igual a 400 para uno o más serovares.

Ninguno de los sueros obtenidos de pacientes con hepatitis por virus B ni con sífilis dio resultado positivo por IFI-IgM.

La sensibilidad y especificidad del ensayo de IFI-IgM para sueros de fase aguda fue de 79% y 100%, respectivamente. El VPP fue del 100% y el VPN no se calculó, ya que, debido a la baja prevalencia los valores, se modifican poco en función de los cambios de la sensibilidad. La IFI-IgM permitió hacer el diagnóstico presuntivo precoz de infección reciente analizando solo la muestra de suero obtenida en la etapa aguda en 32 (62,7%) de 51 pacientes con infección aguda confirmada, pero resultado de MAT negativo en la primera muestra (la figura 11 muestra un resultado positivo).

El valor obtenido para el índice Kappa fue de 1.

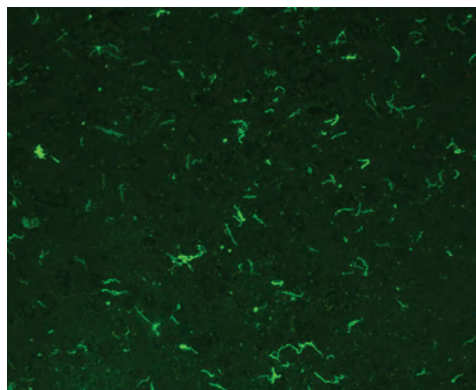


Figura 11. Resultado de la prueba de IFI-IgM utilizada para el diagnóstico rápido de infección por *Leptospira* en seres humanos. Las láminas se sensibilizaron con cepas de varios serovares, y luego de varios pasos de incubación, lavados y marcado con un anticuerpo anti-IgM humana conjugado con fluoresceína se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon® ECLIPSE 80i, filtro de 495 nm) utilizando los objetivos 20X y 40X. Cuando en el suero analizado existen anticuerpos de tipo IgM contra *Leptospira*, como ocurrió en este caso, estas aparecen de color verde intenso con su forma espiralada característica, sobre un fondo oscuro.

Fuente: Paulina Meny y Gustavo Varela. *Revista Médica Uruguaya*, 2014; 30(2), 88-92

El ensayo del test inmunocromatográfico *Aria-Leptospira* IgG/IgM (COMBO RAPID TEST®) (Iglesias *et al.*, 2018) resultó muy específico para la detección de IgM (97%) y, aunque tuvo una baja sensibilidad global (47%), permitió anticipar el resultado de MAT en el 23% de los sujetos con leptospirosis aguda confirmada. En ninguno de los sueros analizados se obtuvo resultado positivo para IgG.

En los ensayos de evaluación de la PCR en tiempo real para diagnóstico (González *et al.*, 2013), solo 183 de los 235 pacientes tenían las dos muestras de suero, aguda y convaleciente (obtenidas entre diez y quince días después) que pudimos analizar mediante MAT. En 98 de 183 pacientes, los resultados de MAT fueron negativos (MAT -/-), 85 fueron positivos y respaldaron un diagnóstico de infección aguda (MAT -/+).

La qPCR pudo detectar hasta 10² leptospirosis/ml en muestras de suero, plasma y sangre completa contaminadas. La detección se produjo antes —en ciclos más bajos— en las muestras de suero contaminadas de forma experimental (figura 12).

Los sueros de 20 pacientes con sífilis, 15 con infecciones agudas de hepatitis B y 98 negativos en dos ensayos MAT consecutivos fueron negativos por el ensayo de qPCR (especificidad 100%). Todas las muestras fueron positivas para el gen *rnaseP* (valor de temperatura de *melting* entre 77°C y 78°C). Solo 26 sueros de fase aguda de los 85 (agudos negativos/positivos convalecientes) que fueron positivos por MAT fueron positivos por qPCR (sensibilidad 30%). Todos mostraron una T_m entre 84°C y 85°C, correspondiente a la T_m esperada para el fragmento de amplificación del gen *lipL32*.

En los pacientes positivos por qPCR, la demora media entre la aparición de los síntomas y la colecta de la primera muestra fue de 8 días. Uno de estos pacientes falleció y otro mostró una enfermedad grave con deterioro de la función hepática y renal.

En cambio, en pacientes con resultados negativos por qPCR, pero positivos por MAT (n=59), el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la extracción de la primera muestra fue de trece días. Todas estas muestras mostraron resultados positivos para el gen *rnasA*P. Ninguno de estos pacientes murió y ninguno tuvo una enfermedad grave.

En concordancia con las estadísticas de los primeros diez años, los pacientes de sexo masculino representaron más del 95% de los 85 casos confirmados de leptospirosis por MAT y eran principalmente trabajadores rurales de 20 a 40 años. El 90% de los pacientes presentó fiebre, fatiga, mialgias y dolores de cabeza, mientras que la hiperemia conjuntival se observó solo en 30%.

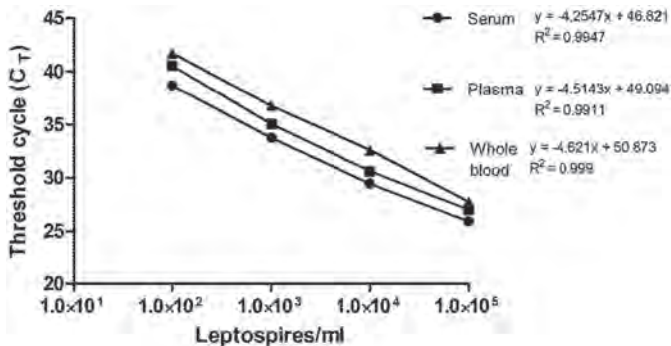


Figura 12. Límites de detección del ensayo *lipL32* qPCR utilizando ADN extraído de muestras de suero, plasma y sangre entera contaminadas con cantidades conocidas de *L. interrogans* Pomona Pomona. Cada punto representa la media de 3 repeticiones de ensayos.
Fuente: González *et al.* (2013).

Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay

Para la evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario (Arriola *et al.*, 2015), de 770 profesionales aleatorizados, 76 médicos y 43 veterinarios completaron los requisitos necesarios, al finalizar la etapa de recolección de datos, para participar del estudio respondiendo un cuestionario.

La media de edad general de la muestra fue 47,5 años. La media de antigüedad en años de ejercicio de la profesión fue de 17,7 años para los médicos y de 22,8 años para los veterinarios (tabla 7). El 75% de los médicos ejercía su profesión sobre todo en Montevideo y el área metropolitana, mientras que el 74% de los veterinarios encuestados lo hacía en el interior.

En cuanto a los conocimientos epidemiológicos sobre leptospirosis humana, las respuestas sobre su incidencia en Uruguay y su mortalidad y sobre el sexo, edad y ocupación de la población afectada fueron, en general, coincidentes y correctas en ambos grupos de profesionales.

En ambos grupos los roedores fueron el reservorio más reconocido. Los veterinarios identificaron en gran proporción también a los bovinos, pero no así los médicos. Estos últimos reconocieron a los animales de producción como posible reservorio de *Leptospira* en bajo porcentaje, si bien la gran mayoría de ellos mencionó al trabajo rural como la ocupación de mayor riesgo (tabla 8).

En cuanto al mecanismo de transmisión de la enfermedad, el 51,3% de los médicos respondió que se da a través de la orina y el 48,7% restante señaló un mecanismo no comprobado en la literatura. Por otra parte, los veterinarios respondieron de forma correcta y significativamente diferente en el 86,1% de los casos (tabla 8).

Las respuestas de médicos y veterinarios sobre sintomatología, diagnóstico y prevención son similares y revelan conocimientos adecuados en general, si bien los médicos reconocen, en mayor proporción, la tos y otras manifestaciones respiratorias como posible expresión de la enfermedad (figuras 13 y 14).

	MÉDICOS		VETERINARIOS		T	P
	MEDIA	DE	MEDIA	DE		
EDAD	45,9	13,02	50,5	12,74	0,017	NS
ANTIGÜEDAD	17,7	13,1	22,8	12,18	0,514	0,036

Tabla 7. Características de la muestra analizada según edad y antigüedad en el desempeño profesional expresadas como *media y desvío estándar (DE)*.

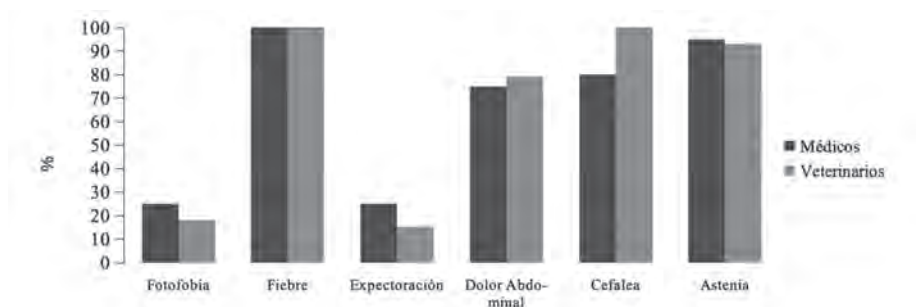


Figura 13. Sintomatología de la leptospirosis. Porcentaje de médicos y veterinarios que identifica cada uno de estos síntomas como manifestaciones de la enfermedad

Casi todos los médicos (98,7%) y veterinarios (97,7%) señalaron a los estudios serológicos como los necesarios para confirmar el diagnóstico de leptospirosis humana, y son estos los estudios de referencia para el diagnóstico de la enfermedad.

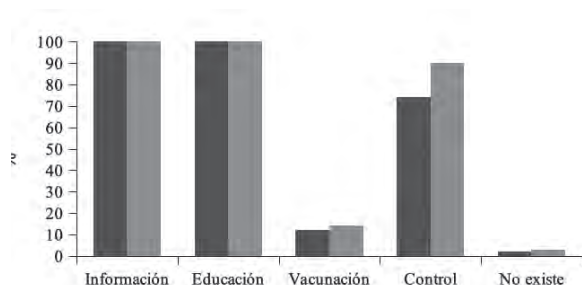


Figura 14. Prevención de leptospirosis humana. Porcentaje de médicos y veterinarios que reconocen a cada una de estas medidas como aplicables al control y la prevención de la leptospirosis.

En la evaluación global de las respuestas brindadas por los profesionales, el puntaje medio obtenido para los médicos y veterinarios fue de 12,08 y 13,01, respectivamente, sobre un máximo de 18 puntos. Al comparar estas medias con el estadístico *t de Student*, obtuvimos un valor *p* no significativo desde lo estadístico (tabla 8).

		MÉDICOS (N = 76)	%	VETERINARIOS (N = 43)	%	VALOR P
INCIDENCIA						
	5	10	13,3	4	9,3	NS
	15	34	45,3	11	22,5	0,038
	50	22	29,3	17	39,5	NS
	150	9	12	11	25,5	NS
MORTALIDAD ANUAL						
	< 10	49	64,47	22	51,16	NS
	10-20	20	26,3	19	44,19	0,046
	> 20	7	9,2	2	4,65	NS
POBLACIÓN AFECTADA						
	HOMBRES	69	90,78	35	81,4	NS
	MUJERES	1	1,32	2	4,65	NS
	NIÑOS	6	7,9	6	13,95	NS
OCUPACIÓN						
	TRABAJADOR RURAL	72	94,74	43	100	NS
	DESOCUPADOS	3	3,95	0	0	NS
	ESTUDIANTES	1	1,32	0	0	NS
	MÉDICOS	0	0	0	0	NS
RESERVORIO						
	ROEDORES	75	98,68	43	100	NS
	OVINOS	6	7,89	16	37,21	< 0,001
	BOVINOS	10	13,16	40	93,02	< 0,001
	SUINOS	21	27,63	28	65,12	< 0,001
	ANIMALES DOMÉSTICOS	18	23,68	32	74,42	< 0,001
	AVES	6	7,89	1	2,33	NS
VÍAS DE TRANSMISIÓN						
	HECES	33	43,42	1	2,33	<0,001
	ORINA	39	51,32	37	86,05	< 0,001
	SECRECIONES RESPIRATORIAS	4	5,26	5	11,63	NS

Tabla 8. Número de médicos y veterinarios que respondieron afirmativamente a cada opción, su porcentaje y valor p resultante de la comparación.

Primera caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental⁷

Ocho hemocultivos fueron reconocidos como positivos en microscopio de campo oscuro en el período 2010-2016. Se confirmó por PCR la presencia de los genes *r6S* y *lipL32*, por lo tanto se definieron como cepas patogénicas de *Leptospira*. Procedían de trabajadores rurales, mayoritariamente de tambos localizados en departamentos del sur del país. Los pacientes tenían entre 32 y 63 años y su evolución fue, en general, severa, con sintomatología general común de fiebre, cefalea, artromialgias y astenia, más compromiso hepático y de otros parénquimas.

Los cultivos fueron habitualmente recuperados en ambos medios empleados (Fletcher y EMJH). En tres casos los ensayos de MAT fueron negativos, sin segunda muestra disponible. Cuando la MAT fue positiva, el serovar más reactivo no coincidió con el que acabó siendo aislado. Se pudo caracterizar seis aislamientos con MLVA-VNTR 4, 7 y 10, secuenciación parcial del gen *r6S*, y análisis adicional por MLST y PFGE para dos de ellos (figuras 15 y 16; tabla 9). Además de la ya reconocida cepa *L. interrogans* Pomona Pomona, se identificaron *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. interrogans* Canicola Canicola o Canicola Portlandvere, *L. interrogans* Sejroe Wolffi o Sejroe Romanica, *L. kirschneri* Australis Ramisi y *L. kirschneri* Pomona Mozdok. Como no se tuvieron antisueros absorbidos, para dos aislamientos no fue posible diferenciar el serovar entre dos opciones con los métodos disponibles. El análisis de las secuencias de amplicones de los siete genes estudiados permitió asignar por MLST la cepa de serovar Kennewicki al ST 140 y la del serogrupo Canicola al ST 37. Un hemocultivo posterior permitió aislar una cepa adicional identificada como *L. borgpetersenii* Ballum Ballum (tabla 9).

En total, se obtuvieron nueve aislamientos positivos de muestras ambientales: dos de ellos de colecciones de agua en asentamientos montevidEOS, uno de Isla de Lobos y seis de establecimientos agropecuarios visitados para toma de muestras humanas o animales (tabla 10). Seis se identificaron como *L. biflexa* por medio de reacciones positivas de PCR *r6S* y *23S*, que es propia de esta especie. Otra cepa con PCR para *r6S* positivo fue identificada como *Leptonema illini* por secuenciación del amplicón obtenido. Por último, dos cultivos positivos en PCR *r6S*, pero negativos por PCR *23S* y *lipL32* PCR fueron caracterizados también por secuenciación del producto PCR como *L. meyeri*, una especie saprofítica o parcialmente patogénica.

7 Meny y cols. (2017).

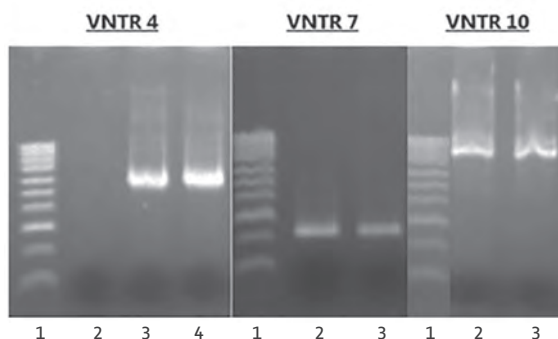


Figura 15. Ejemplo de resultados obtenidos mediante ensayos VNTR con el aislado humano AH2 correspondiente a *L. interrogans* Pomona Kennewicki. VNTR 4: carril 1, marcador de ADN de 100 pb (Bioline, Meridian®; carril 2, control negativo; carril 3, aislado #il 4, cepa IH23 *L. interrogans* Pomona Kennewicki. VTR7: carril 1, marcador de ADN de 100pb; carril 2, aislado # AH2; carril 3, cepa *L. interrogans* Pomona Kennewicki. VNTR 10: carril 1, marcador de ADN de 100pb; carril 2, aislado # AH2; carril 3, cepa *L. interrogans* Pomona Kennewicki.

ID DE LA CEPA	RESULTADO MAT	PCR LIPL32/ 16S	PCR 23S	MLVA	PATRÓN PFGE	ST	SECUENCIACIÓN GEN 16S	IDENTIFICACIÓN
AH1	+/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Pomona Pomona
AH2 *2	-/ND	+/+	NC	5-0-10	<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki	140	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki
AH3 *3	-/ND	+/+	NC	1-10-3	<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola/ Portlandvere	37	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola/ Portlandvere
AH4 *6	-/+	+/+	NC	3-2-11	NR	NR	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolff/ Romanica
AH5*10	+/ND	+/+	NC	1-5-4	NR	NR	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. kirschneri</i> Australis Ramisi
AH6 *6	-/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. kirschneri</i> Mozdok?
AH7	-/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i> Ballum

Tabla 9. Características de los aislamientos de *Leptospira* de seres humanos. (*) Días transcurridos entre el inicio de los síntomas y la recolección de sangre para hemocultivo. Resultado MAT, primera muestra/segunda muestra. NC: no corresponde; NR: no realizado; ND: no disponible.

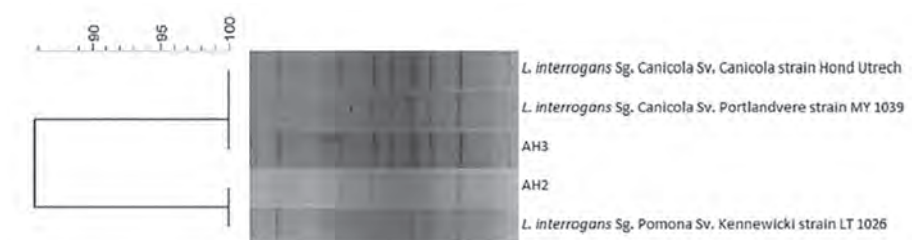


Figura 16. Imagen de *NotI*-PFGE y dendrograma que muestran que el patrón de la cepa AH2 coincide con el de la cepa de referencia *L. interrogans* Pomona Kennewicki y el patrón de la cepa AH3 corresponde a los de *L. interrogans* Canicola Canicola y Canicola Portlandvere.

ID DE LA CEPA	ORIGEN	PCR LIPL32/ 16S	PCR 23S	SECUENCIACIÓN GEN 16S	IDENTIFICACIÓN
AA1	Agua de asentamiento	-/+	-	<i>L. meyeri</i>	<i>L. meyeri</i>
AA2	Agua de asentamiento	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA3	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA4	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA5	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA6	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA7	Agua de tambo o granja rural	-/+	-	<i>L. meyeri</i>	<i>L. meyeri</i>
AA8	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>
AA9	Agua de pozo*	-/+	+	NR	<i>L. biflexa</i>

Tabla 10. Características de los aislamientos de *Leptospira* recuperados de muestras ambientales. (*) de la Isla de Lobos

Seroprevalencia de leptospirosis en grupos humanos en riesgo debido a factores ambientales, laborales o sociales

El estudio de leptospirosis en grupos humanos en riesgo incluyó a 308 personas: 300 integrantes de cinco grupos sociales en riesgo y un pequeño grupo de ocho personas (*otros*, no expuestos) que se compuso por algunos miembros del personal de salud y algunos estudiantes o asistentes a las reuniones de intercambio. La distribución por sexo fue: 88 mujeres y 220 varones. De los 300 sueros de personas en riesgo 139 (46,3 %: rango 41,1-64,0 en los diferentes grupos) reaccionaron con antígenos específicos en IFI-IgM o MAT (tabla 11), lo que reveló un posible contacto con *Leptospira*. La seroprevalencia en el grupo *otros* fue del 12,5%.

Los trabajadores de tambos revelaron una mayor frecuencia de reactividad serológica que la de los trabajadores de arrozales o los recicladores de residuos ($p < 0,05$).

GRUPO ESTUDIADO	REACTIVO POR IFI-IGM O MAT		TOTAL EN EL GRUPO		PORCENTAJE DE REACTIVIDAD (IFI-IGM O MAT)	
	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJER	HOMBRE
ASENTAMIENTOS	13	7	17	19	76,5	36,8
RECICLADORES DE RESIDUOS	18	12	36	37	50	32,4
TRABAJADORES DE ARROZALES	3	52	11	117	27,3	44,4
TAMBEROS	1	15	5	20	20	75
VETERINARIOS	10	8	16	22	62,5	36,4
OTROS, SIN FACTORES DE RIESGO	1	0	3	5	33,3	0
TODOS LOS GRUPOS	45	94	35	215	52,9	43,7

Tabla 11. Sueros reactivos según IFI-IgM o MAT en hombres y mujeres de los diferentes grupos de riesgo.

GRUPO ESTUDIADO	GRUPO ETARIO (EN AÑOS)					PORCENTAJE DE REACTIVOS
	13-29	30-49	50-73	SIN DATO	TOTALES	
ASENTAMIENTOS	11/18	4/10	3/5	2/3	20/36	55,5
RECICLADORES DE RESIDUOS	11/22	12/33	4/13	3/5	30/73	41,1
TRABAJADORES DE ARROZALES	15/36	31/60	9/28	0/4	55/128	43,0
TAMBEROS	3/3	6/10	5/9	2/3	16/25	64,0
VETERINARIOS	7/9	8/20	2/8	1/1	18/38	47,4
OTROS, SIN FACTORES DE RIESGO	0/3	1/4	0/1	0/8	1/8	12,5
TODOS LOS GRUPOS	47/88	61/133	23/63	8/16	139/300	46,3

Tabla 12. Sueros reactivos según IFI-IgM o MAT según la edad de las personas pertenecientes a los diferentes grupos de riesgo.

La reactividad de los sueros fue más frecuente cuando fue evaluada por IFI-IgM (124 de 300; 41,33%) que cuando fue estudiada por MAT (38 de 300; 12,66%) ($p < 0,05$). La reactividad por IFI-IgM fue especialmente frecuente en el suero de los recicladores de residuos, y los sueros IFI-IgM negativos/MAT reactivos se encontraron a menudo en trabajadores de arrozales. Solo un suero reactivo por MAT se encontró en recicladores de residuos.

Los serogrupos reactivos con mayor frecuencia fueron Icterohaemorrhagiae en trabajadores de tambos; Canicola en habitantes de asentamientos; Canicola, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae y Mini en trabajadores de arrozales; Pomona, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae entre veterinarios. La cepa de referencia Canicola Canicola reaccionó con quince sueros, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae y Autumnalis Autumnalis con doce, Mini Mini con once y Pomona Kennewicki con cuatro.

Los sueros de las mujeres fueron más reactivos que los de hombres. Al estratificar el análisis por grupos, se encontraron algunas asociaciones significativas: mayor reactividad sérica de mujeres expuestas que de hombres entre los habitantes de asentamientos, lo contrario en los trabajadores de tambos ($p < 0,05$ en ambos casos).

La edad de las personas estudiadas osciló entre 13 y 73 años —media de $38,3 \pm 13,3$ —. El promedio de edad de los hombres (38,6) y las mujeres (37,4) no fue significativamente diferente cuando se examinó con la prueba t. Sin embargo, fue diferente en los distintos grupos de riesgo. Los habitantes de los barrios marginales fueron los más jóvenes (media de 31,6), seguido por veterinarios (36,0) y luego recicladores (37,4). Los trabajadores de arrozales

(40,2) y de granjas lecheras (44,0) tenían las edades medias más altas, estadísticamente diferentes de las de los habitantes de los barrios marginales.

La mayoría de las personas analizadas y la mayoría de los sueros reactivos pertenecían a los grupos más jóvenes. El promedio de edad de 139 personas en riesgo con sueros reactivos ($X=36,4$) fue ligeramente menor que la edad de los que dieron resultados negativos ($X=39,8$) ($t=2,11$; $p < 0,05$ para muestras independientes) (tabla 12).

Considerando los síntomas y signos de enfermedad experimentados en semanas anteriores, solo la hiperemia conjuntival y las manifestaciones abdominales —dolor, diarrea, vómitos, enfermedad hepática— fueron definidamente más frecuentes en las personas que mostraban sueros reactivos que en las personas con resultado negativo ($p < 0,05$).

La encuesta detectó siete sueros altamente reactivos en MAT (títulos ≥ 400) de trabajadores que habían estado enfermos, que lo estaban en ese momento o que desarrollaron luego leptospirosis clínica. Se identificaron en dos lugares de trabajo: cinco personas en un campo de arroz y dos en un tambo. Todos eran varones de mediana edad que estaban en contacto con bovinos y otros animales. Sus síntomas, entre otros, fueron manifestaciones generales inespecíficas como fiebre, dolor de cabeza, astenia y dolor articular y muscular, con evidencia agregada de afectación del sistema digestivo o de los riñones en cuatro casos. Todos tenían servicios de atención de salud accesibles, pero el diagnóstico de laboratorio no se logró con facilidad.

El 15% de las 300 personas potencialmente expuestas no recibió educación formal o no había completado el ciclo de educación primaria; el 67,2% había terminado la escuela primaria o no tenía educación secundaria completa; el 5,5% había completado la educación secundaria o iniciado estudios universitarios; el 14,7% tenían estudios universitarios terminados. Por ende, más de la mitad de las personas estudiadas (55,7%) podría clasificarse como perteneciente a un nivel socioeducativo bajo (33,3%) o medio/bajo (22,4%); el 21,3% de nivel medio, y casi un cuarto de ellos de nivel medio/alto (8,3%) o alto (14,7%). Las frecuencias de sueros reactivos no fueron estadísticamente diferentes entre los distintos niveles socioeducativos (Chi cuadrado=3,51; $gl=4$; $p > 0,05$). Tampoco se encontró asociación entre otros indicadores combinados y la frecuencia de reactividad serológica.

CATEGORÍA	NIVEL SOCIOECONÓMICO
ALTO	Estudios universitarios completos.
MEDIO ALTO	Educación secundaria completa o estudios universitarios incompletos. Con ninguna, una o dos situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar. Educación secundaria incompleta, sin situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar.
MEDIO	Educación secundaria completa o estudios universitarios incompletos. Tres situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar. Educación secundaria incompleta. Una o dos situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar. Primaria completa o educación secundaria incompleta, sin situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar.
MEDIO BAJO	Educación secundaria incompleta. Tres situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en casa. Escuela primaria completa con una, dos o tres situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en casa.
BAJO	Escuela primaria incompleta o sin educación formal. Habitante de barrios marginales o trabajador de reciclaje de desechos.

Tabla 13. Categorías del indicador combinado nivel socioeconómico.

Todos los veterinarios y los trabajadores de tambos tuvieron contacto con varios tipos de animales, sobre todo con bovinos. Los habitantes de barrios marginales y los recicladores de residuos tenían el mismo nivel de contacto, pero los animales involucrados fueron, en su mayoría, perros, caballos y roedores. Los trabajadores de los arrozales dijeron haber tenido contacto con una amplia variedad de animales, además de los ya mencionados, como ovejas y cerdos, entre otros.

Todos los recicladores de residuos y los trabajadores de arrozales con sueros reactivos tuvieron contacto con animales. Entre aquellos con sueros negativos, 9 de los primeros y 19 de los segundos no lo tuvieron, lo que sugiere que el contacto con animales pudo haber estado relacionado con la reactividad ($p < 0,05$). Entre las 300 personas en riesgo encuestadas, el 49,3% de las que tenían animales alrededor de sus hogares mostraron sueros reactivos. Sin embargo, la reactividad fue del 34,3% en personas que no dieron cuenta de tener contacto estrecho con animales ($p < 0,05$).

Los roedores estaban presentes en el entorno laboral o de vivienda de la gran mayoría de las personas entrevistadas. Los sueros fueron reactivos en el 49% de las personas que observaron roedores en su entorno y en el 30,2% en personas que no lo hicieron ($p < 0,05$). En particular, el 48,2% de quienes declararon la presencia cercana de roedores en el lugar de trabajo tenían sueros reactivos, contra el 30,4% de quienes afirmaron no trabajar cerca de los roedores ($p < 0,05$).

Los sueros de caballos fueron reactivos con frecuencia en las pruebas MAT, incluso en una mayor proporción que las muestras de perros (tabla 14, $p < 0.05$), sobre todo en los arrozales. Canicola fue el serogrupo más frecuentemente reactivo en MAT de perros; Icterohaemorrhagiae en MAT de caballos.

SITUACIÓN	PERROS			CABALLOS		
	REACTIVO	NO REACTIVO	REACTIVO (%)	REACTIVO	NO REACTIVO	REACTIVO (%)
ASENTAMIENTO	5	17	22,7	1	4	20,0
ARROZALES	3	17	15	8	4	66,7
TAMBOS	0	8	0	2	3	40,0
TOTALES	8	42	16,0	11	11	50,0

Tabla 14. Resultados de MAT en muestras de suero obtenidas de perros y caballos.

La mayoría de los habitantes de barrios marginales y los recicladores de residuos —ambos mostraron sueros reactivos— utilizaron agua segura para beber y para otras actividades. Lo contrario ocurrió con los trabajadores de los tambos.

Los veterinarios y los trabajadores de arrozales usaban uno u otro tipo de agua, pero en el último grupo, los trabajadores con sueros reactivos emplearon agua de fuentes inseguras con mayor frecuencia (50 de 55) que los trabajadores que mostraron resultados no reactivos (47 de 72) ($p < 0,05$). En total, el 38,3 % de las personas que utilizaron fuentes seguras de agua tuvieron sueros reactivos. A su vez, las cifras fueron del 50,7% para aquellas personas que emplearon agua no potable de tanques, pozos o espejos de agua naturales (Chi cuadrado=4,14 para 1 gl; $p < 0,05$).

Casi todos los trabajadores encuestados usaban zapatos o botas de seguridad, pero solo el 76% de ellos usaba guantes. Las diferencias en la reactividad no fueron significativas entre estos dos grupos.

La frecuencia de reactividad no fue diferente para las personas expuestas o no a fuentes de agua potencialmente contaminada, tanto en general como en cada grupo estudiado. Considerando los grupos por separado, la mayoría los habitantes de los barrios marginales estuvieron expuestos (92%) más que los miembros de los otros grupos en riesgo estudiados, que a menudo también estuvieron expuestos (47%) ($p < 0,05$).

Los sueros de personas que vivían en áreas expuestas a inundaciones fueron reactivos con mayor frecuencia que aquellas de personas que habitaban zonas no inundables.

Para evaluar en profundidad los factores probablemente asociados con reactividad sérica (variable dependiente), se hizo un análisis de regresión logística final. Los resultados mostraron que las variables que se asociaron con

la reactividad sérica fueron la presencia de animales o el contacto con ellos en el hogar, trabajo o su entorno: *odds ratio* (OR) 4,96 (1,29-19,07 con 95% de confianza); la presencia de roedores o el contacto con ellos en el hogar, trabajo o su entorno: OR 2,79 (1,32-5,91); el uso de agua no potable para lavar y limpiar en el trabajo: OR 1,82 (1,10-3,01), y la exposición del hogar a inundaciones: OR 1,54 (1,01-2,055).

La probabilidad de tener un suero reactivo aumentó con la disminución de la edad: los sueros de los sujetos jóvenes tuvieron más probabilidad de ser reactivos. El antilogaritmo del coeficiente beta para edad fue 0,98 (límites con IC 95%=0,96-0,998).

En este período de trabajo se obtuvieron seis aislamientos de *Leptospira* spp de muestras de agua. Cinco fueron identificados como cepas no patógenas de *L. biflexa* y una como *L. meyeri*, como se detalló más arriba.

La observación de los lugares, el intercambio de información y las charlas sobre prevención se llevaron a cabo con éxito en la mayoría de las visitas a los grupos en riesgo, lo que dio continuidad a las actividades comunitarias de años previos. En general, hubo una cálida bienvenida, apoyo y colaboración de parte de todos los participantes hablar sobre la leptospirosis, su epidemiología y factores de riesgo, las dudas y los miedos de las personas expuestas, los signos y síntomas en pacientes enfermos y sujetos relacionados resultó útil tanto para los trabajadores como para el equipo de salud e investigación.

Bovinos y otros componentes del reservorio animal

Los estudios del reservorio bovino de *Leptospira* mostraron cifras de seroprevalencia de anticuerpos por MAT iguales o superiores a 20% de los animales estudiados en diferentes oportunidades, con especial reactividad de los serogrupos Pomona y Sejroe (serovares Hardjo y Hardjo bovis). Más del 70% de los predios examinados mostraban algún animal positivo (Puentes *et al.*, 2011).

Se recuperaron numerosos cultivos positivos, de los cuales fue posible conservar veinte aislamientos para estudiarlos e identificarlos. La mitad de ellos procedían de riñones u orinas tomados en frigoríficos y el resto de orina u órganos de animales muestreados en campo o autopsia, de rodeos presuntamente infectados según síntomas y signos clínicos, presencia de abortos o por asociación con casos humanos confirmados.

El análisis de estos aislamientos, hecho con las técnicas y herramientas ya detallados, reveló que correspondían mayoritariamente a *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo bovis o *L. noguchii* Autumnalis. Una cepa fue identificada como *L. interrogans* Canicola Canicola.

Las cepas recuperadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido, junto con las recuperadas de otros animales y de seres humanos (Zarantonelli *et al.*, 2018).

Resultados preliminares de análisis de pinnípedos indican que el 62,5% (30 de 48) de los sueros de animales adultos analizados mostró resultado positivo por MAT. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies (lobos marinos *Arctocephalus australis* y leones marinos *Otaria flavescens*). Los serovares reactivos con más frecuencia fueron Pyrogenes, Canicola, Cynopteri y Australis, en ese orden. Las 56 muestras de *Arctocephalus australis* jóvenes fueron negativas en muestras tomadas por dos equipos de trabajo en años diferentes.

Los datos en elaboración sobre leptospirosis en equinos y referentes humanos muestran una seroprevalencia de anticuerpos con títulos mayores o iguales a 100, reveladora de contactos infectantes, próxima a 45 % en los animales, con diferencias según el grupo examinado: prevalencias inferiores en studs y altas en equinos para faena.

Entre otros, los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Ballum fueron los reactivos con mayor frecuencia. Hasta ahora, solo se ha confirmado un aislamiento positivo, identificado presuntivamente como *L. interrogans* Louisiana.

En cuanto a referentes humanos, solo se observó por el momento reactividad en dos trabajadores de establecimientos ganaderos, con títulos menores o iguales a 200, sin sintomatología asociada.

Los estudios en roedores revelan hasta el momento una frecuencia de anticuerpos en suero (con títulos mayores o iguales a 100) inferior al 10%, con reactividad predominante en MAT del serogrupo Icterohaemorrhagiae, y el aislamiento de dos cepas caracterizables de modo preliminar como del mismo serogrupo, característico de las especies de animales examinadas: *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*. Por ahora, se ha evidenciado un solo resultado positivo de PCR en tejido renal, pero dos ejemplares capturados en asociación con colonias de pinnípedos revelaron presencia de *Leptospira* en riñones, con técnica de inmunofluorescencia directa empleando conjugado policlonal de conejo anti-*Leptospira* (LEP-FAC *Leptospira* multivalent fluorescent antibody conjugate, rabbit origin, USDA, APHIS, VS, AMPS. IA 50010, Estados Unidos).

Datos primarios sobre los estudios en perros revelan una seroprevalencia de infección variable según localización de muestreo, que es máxima en perros de barrios periféricos y asentamientos de Montevideo (22,7%) y mínima en tambos, con escasas muestras. Los serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae fueron los principalmente reactivos, con frecuentes reacciones cruzadas para otros serogrupos.

Discusión y conclusiones

De acuerdo con los objetivos de este trabajo, comentaremos, en primer lugar, la metodología incorporada y evaluada para el estudio de la leptospirosis individual o grupal. En segundo lugar, nos referiremos a los resultados obtenidos sobre las características clínicas y epidemiológicas de la infección y su vinculación con los conocimientos obtenidos sobre el reservorio animal. Por último, concluiremos con breves reflexiones sobre las líneas de pensamiento que guiaron la secuencia de las investigaciones.

Sobre metodología y evaluación de procedimientos de estudio

La técnica de microaglutinación MAT con cepas vivas de *Leptospira* fue incorporada con éxito en nuestro laboratorio gracias al trabajo constante de técnicos dedicados a la difícil tarea de cultivo seriado, mantenimiento y verificación de la identidad de las cepas empleadas en el procedimiento. Los criterios de interpretación y títulos de corte definidos en ensayos preliminares probaron ser efectivos en su aplicación diagnóstica.

Durante años, la MAT ha sido la técnica de referencia que permitió el diagnóstico de cientos de casos, contra la cual hemos evaluado métodos de estudio rápidos, sencillos o complementarios.

Utilizada como única técnica en la práctica rutinaria, permite el diagnóstico de la infección solo en una minoría de los pacientes estudiados porque, debido al ascenso relativamente tardío de los anticuerpos aglutinantes (figura 4), requiere el envío de dos muestras. La segunda muestra se omite en más del 50% de los casos por desconocimiento técnico, falta de interés que deriva de la buena evolución de los pacientes, sus dificultades de acceso o su falta de colaboración.

Por otra parte, con este procedimiento laborioso se obtienen resultados a veces tardíos que no contribuyen al manejo inicial de los pacientes.

Los serogrupos con frecuencia reactivos en las pruebas MAT hechas para el trabajo diagnóstico no deben considerarse como las variantes responsables de las infecciones. Estos no muestran de manera confiable la variante infecciosa de *Leptospira* porque existe una amplia reactividad cruzada en la fase aguda de la enfermedad (Scialfa, Bolpe, Bardón, Ridao, Gentile y Gallicchio, 2010; Smythe *et al.*, 2009). La especificidad relativa de serogrupo de la respuesta de anticuerpos en general mejora en las muestras convalecientes tardías (ver en la tabla 3 el resultado de la prueba MAT con la tercera muestra

del paciente infectado por *L. interrogans* Pomona Pomona). Hemos podido reconocer este efecto en muestras seriadas de algunos pacientes y verificarlo comparando la breve serie de aislamientos humanos obtenidos con las variantes prevalentes en los resultados MAT (Meny *et al.*, 2017). Esto obliga a persistir en la tarea de cultivo e identificación de aislamientos (práctica no desarrollada en el siglo xx en nuestro medio) para conocer las cepas circulantes y relevantes en términos epidemiológicos. Su reconocimiento permite, además, como lo estamos haciendo, incorporarlas al panel de las cepas para diagnóstico por MAT y otras técnicas, mejorando de ese modo la sensibilidad de los métodos.

En cambio, la frecuencia relativa de los serogrupos reaccionantes en los relevamientos serológicos humanos o animales puede orientar con mayor fidelidad al conocimiento de las variantes circulantes, porque la MAT revela, en estos casos, una proporción probablemente importante de infecciones ya evolucionadas, en las cuales los anticuerpos de tipo IgG e IgM persisten durante meses (figuras 4 y 7).

Reconociendo las limitaciones de la técnica descrita, se consideró conveniente trabajar para validar e instalar pruebas de mayor sensibilidad en etapas iniciales mediante la detección de anticuerpos, antígenos leptospíricos o su ADN que permitan un diagnóstico de la enfermedad en la primera etapa (figura 4), cuando el tratamiento es más eficaz, mejora las posibilidades de curación del paciente y puede evitar la progresión a formas más severas.

Se ensayaron varios métodos de fácil ejecución en nuestro laboratorio de manera sucesiva para el diagnóstico indirecto precoz de la leptospirosis humana, los cuales presentan un adecuado rendimiento diagnóstico y se pueden utilizar como complemento para la MAT. Su utilidad en Uruguay no había sido previamente determinada (Maze, Sharples, Allan, Rubach y Crump, 2019; Hull-Jackson *et al.*, 2006).

La prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente es de utilidad para el diagnóstico rápido de leptospirosis, en tanto evita el manejo y mantenimiento de cultivos vivos de leptospiras y es de fácil ejecución y bajo costo, ya que no requiere equipos, reactivos especiales ni entrenamiento especial del personal técnico.

La macroaglutinación resultó menos sensible que la MAT, pero logró una reacción positiva más temprana. Fue capaz de detectar cerca del 70% de las infecciones luego confirmadas por MAT, lo cual significa que tuvo una sensibilidad valiosa para el diagnóstico (tabla 4). Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta técnica detectó el 58,44% de 77 pacientes con infección aguda confirmada por dos pruebas de MAT sucesivas —la primera negativa, la segunda positiva— (tabla 5).

La buena especificidad lograda (85,38%) está respaldada por el hecho de que no se obtuvieron reacciones cruzadas con los sueros de pacientes con otras enfermedades. Los altos valores de VPN obtenidos señalan que, al

obtener un resultado negativo por medio de esta prueba, existe una probabilidad elevada de que se trate de un paciente no infectado. Si bien los valores de VPP son aceptables, se podrían mejorar al aumentar la especificidad de la prueba, por ejemplo, en cuanto a la pureza del antígeno utilizado o su composición con las cepas prevalentes en el medio.

En cambio, la sensibilidad del ELISA fue muy elevada (95%) (tabla 6), lo cual sugiere que un resultado positivo en esta prueba, incluso si la MAT es aún negativa, puede ser de gran utilidad diagnóstica cuando solo se dispone de una muestra. Sumado a la alta especificidad del ensayo (95,83%) y al alto índice de Youden registrado, esto respalda su utilidad. Los valores son incluso mejores que los revisados en la bibliografía para diseños similares (Rosa *et al.*, 2017). En este sentido, el resultado del ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto se pueda derivar la muestra a un laboratorio de referencia para confirmación por MAT, lo que constituye una ventaja de este ELISA respecto a la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, que proporciona mayor cantidad de resultados falsos negativos.

El ELISA fue claramente más sensible que MAT en etapas tempranas de la infección, es fácil de estandarizar, los antígenos se pueden almacenar por mucho tiempo, no tiene casi ningún riesgo para el personal técnico y presenta pocas reacciones cruzadas con infecciones por otros gérmenes. Es así que la prueba de ELISA normalizada resultaría de gran utilidad en el tamizaje ante focos de leptospirosis, por sus ventajas en cuanto a sensibilidad, posibilidad de automatización y de procesamiento de gran número de muestras en simultáneo y en corto tiempo.

En la actualidad, se está empleando con criterio cuantitativo y cualitativo en la evaluación de la respuesta inmune diferencial en ambos sexos.

En nuestro proyecto inicial, la técnica de inmunofluorescencia practica-da mostró capacidad de revelar presuntas infecciones de forma precoz, pero su sensibilidad fue baja.

El método se ensayó una vez más de modo organizado años después para la detección de IgM específica. La IFI-IgM de elaboración propia mostró una sensibilidad del 79% y una especificidad del 100% cuando se comparó con la MAT. Las cifras de especificidad y de VPP también fueron comparables con los datos obtenidos por otros autores, lo que sugiere que la IFI-IgM es una prueba útil para definir el diagnóstico y tomar decisiones terapéuticas cuando el resultado es positivo en la primera muestra de suero (Pradutkanchana, Pradutkanchana y Khuntikij, 2003). La IFI-IgM aparece como una herramienta válida para el diagnóstico temprano (etapa aguda, menos de diez días tras el inicio de los síntomas) de pacientes con leptospirosis, sobre todo en aquellos con primera prueba de MAT negativa. Contando con la experiencia necesaria, la capacidad técnica y el criterio uniforme, estamos considerando incorporarla como ensayo rutinario.

En cuanto a las desventajas, esta técnica necesita un microscopio de luz UV para la lectura. Como ocurre con la MAT la IF no identifica los serovares involucrados y su resultado negativo no descarta la infección. Teniendo en cuenta esto último, para descartar o confirmar la infección se requiere analizar por MAT o por IF una segunda muestra de suero obtenida luego de un período entre diez y veinte días de la primera.

En nuestro estudio de grupos humanos en riesgo (Meny *et al.*, 2019), se practicaron MAT e IFI-IgM en los sueros de las personas evaluadas y se encontraron más sueros reactivos por IFI-IgM que por MAT. Este resultado no se puede explicar como causado por una baja especificidad de IFI, ya que este método no mostró resultados falsos positivos en los ensayos anteriores. Esto puede deberse a la baja sensibilidad conocida de MAT cuando se estudian infecciones recientes o al uso de cepas vivas localmente no prevalentes como reactivos antigénicos, por lo cual se están incluyendo las cepas aisladas en el país en el panel MAT, para mejorar su rendimiento. La detección temprana de nuevas infecciones es más fácil con IFI-IgM que con MAT, y las infecciones recientes fueron, al parecer, frecuentes en algunos grupos expuestos en especial, como en los recicladores de residuos (30 por IFI de 30 reactivos, 29 de ellos no reactivos por MAT). En sueros negativos por IFI-IgM, se encontró reactividad MAT, que explora tanto IgG como IgM, en diez trabajadores del campo de arroz y otros, hecho que puede interpretarse como revelador de contactos pasados o antiguos con títulos de IgG persistentes.

La prueba inmunocromatográfica comercial evaluada es un procedimiento sencillo, rápido y útil para aplicar en el primer nivel de atención sanitaria, sobre todo en aquellas personas pertenecientes a los grupos de riesgo mencionados más arriba, aunque es necesario analizar una segunda muestra (obtenida entre diez y quince días después) cuando el resultado de la primera haya sido negativo. Debemos tener en cuenta la falla verificada del test ensayado para la detección de IgG anti *Leptospira*, la cual determinará resultados falsos negativos, sobre todo luego de la fase aguda, cuando desaparezcan o disminuyan los anticuerpos de tipo IgM (figura 4).

El aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras clínicas y ambientales (Ifiran, 2006; Meny *et al.*, 2017; Zarantonelli *et al.*, 2018), primero humanas y luego animales, es de práctica reciente en Uruguay, tras un extenso período en el cual el conocimiento diagnóstico y epidemiológico de esta zoonosis se basaba solo en el estudio clínico y los métodos indirectos de análisis. Nuestro grupo ha informado los primeros resultados en el país de aislamiento e identificación de cepas infectantes, lo que representa una contribución y un avance sólido en la tarea de control de la leptospirosis (tablas 8 y 9).

Respecto al aislamiento a partir de hemocultivos humanos, quedó demostrada su gran dificultad y no aportó de manera sustantiva como método de diagnóstico de la infección. Sin embargo, tiene mucho valor intentar el

cultivo, sobre todo en laboratorios de referencia, para poder definir las características de las cepas circulantes y establecer vínculos epidemiológicos.

Los medios de cultivo utilizados permiten el crecimiento de microorganismos contaminantes, lo que representa un problema al llevar a cabo los aislamientos. Los microorganismos contaminantes (en este caso bacterias de la microbiota cutánea) compiten por los nutrientes, y su velocidad de duplicación es mayor que la de *Leptospira*. Además, en los procedimientos de filtrado por membranas de poro 0,22 µm para purificación, algunas variantes se pueden retener.

Los medios empleados —sobre todo, Fletcher y EMJH— fueron efectivos por igual en la obtención de aislamientos. Su número representó, sin embargo, poco más del 2% de las muestras analizadas. Esta proporción no es satisfactoria y podría ser mejorada con observación precoz, frecuente de los cultivos y repetición de subcultivos para mantenimiento (Mgode *et al.*, 2015; Matthias *et al.*, 2008; Wuthiekanun *et al.*, 2007). El rendimiento relativamente escaso se puede atribuir a diferentes factores, como uso de anticoagulantes inapropiados, tratamiento intercurrente con antibióticos o extracción de sangre fuera del período leptospirémico inicial de cinco a diez días. En adelante, una selección más estricta de muestras precoces puede mejorar la proporción de cultivos positivos, aunque quizá reduzca el número total de aislamientos obtenibles.

La mayoría de los pacientes que revelaron cultivos positivos eran mayores que el promedio de edad de los diagnosticados como infectados según MAT. Su enfermedad fue en particular severa, con ictericia, disfunción orgánica e internación prolongada. Una alta carga bacteriana orgánica y circulante puede explicar estos hechos coincidentes. De tres pacientes con hemocultivo positivo (y resultado obviamente diferido) se tuvo solo una primera muestra de suero para MAT y fue negativa. Esto enfatiza la necesidad de bregar por el envío de dos muestras, y jerarquiza la importancia de los ensayos de tamizaje precoz para detección de IgM específica.

Los aislamientos humanos fueron diversos en nuestros estudios (tabla 9), y correspondieron a especies reconocidas como patogénicas. La expectativa respecto a los aislamientos ambientales (tabla 10) a partir de muestras de agua era identificar cepas saprofitas y también patogénicas, ya que fueron tomadas de sitios donde estas últimas circulan en seres vivos y es conocida la capacidad de ambos tipos de cepas de sobrevivir de modo prolongado en el ambiente (Trueba, Zapata, Madrid, Cullen y Haake, 2004; Mason, Encima, Sreevatsan y Muñoz-Zanzi, 2016; Schneider *et al.*, 2018). Sin embargo, fueron, en general, de la especie saprofita *L. biflexa*, con excepción de dos caracterizadas como *L. meyeri*. Estas son difíciles de clasificar, porque la especie incluye serovares patógenos como Sophia, saprófitas como Semaranga y otras como Perameles y de Ranarum, que pueden encontrarse en ambos grupos, por lo cual vale la pena procurar su caracterización detallada con

sueros absorbidos u otros procedimientos (Peláez Sánchez, Lopez, Pereira, Arboleda Naranjo, Agudo-Flórez, 2016).

La complejidad y el comportamiento de la MAT y los cultivos nos llevó también a evaluar el rendimiento diagnóstico de técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de la infección temprana por *Leptospira* en fase de leptospiremia (figura 4). Estos métodos proporcionan un diagnóstico rápido y pueden ser positivos antes de la aparición de anticuerpos detectados por las pruebas MAT, IF o ELISA.

El ensayo qPCR local mostró una alta sensibilidad analítica al detectar 10^2 bacterias por ml en el ADN extraído de muestras de suero, plasma o sangre completa inoculadas por nosotros con una cantidad conocida de bacterias viables (figura 12). Este valor es superior al informado antes (Stoddard, Gee, Wilkins, McCaustland y Hoffmaster, 2009). La sensibilidad de la qPCR para identificar a los individuos infectados fue solo del 30%, valor menor que el de la MAT. Si bien este hallazgo es coherente con reportes anteriores, nuestra cifra fue menor que los valores cercanos al 50% reportados por otros autores (Thaipadunpanit *et al.*, 2011; Pérez y Goarant, 2010).

Esta baja sensibilidad diagnóstica puede deberse a varios factores: la mayoría de los casos de leptospirosis son leves y desarrollan bacteriemia de menos de 10^2 leptospiras/ml. A menudo, las muestras se obtienen cuando hay anticuerpos presentes, varios días después del inicio de la enfermedad o después de iniciar el tratamiento con antibióticos. Se sabe que estos factores disminuyen las posibilidades de recuperar leptospiras de la sangre por cultivo y también de obtener resultados positivos mediante métodos de amplificación de ADN *in vitro* (Stoddard *et al.*, 2009; Thaipadunpanit *et al.*, 2011).

En la mayoría de los pacientes con reacciones MAT -/+ y resultados negativos por qPCR (n=59) habían transcurrido más de trece días entre el inicio de la enfermedad y la recolección de la primera muestra de suero (figura 4). Además, en muchos de estos pacientes la detección de anticuerpos IgM por ensayo de inmunofluorescencia fue positiva. Por último, las muestras que usamos habían sido congeladas y almacenadas a -20°C , lo que podría disminuir el número de leptospiras detectables en las muestras.

La qPCR nos permitió hacer un diagnóstico temprano y rápido en 26 de 85 pacientes (2 con enfermedad grave) antes de que se pudiera obtener un resultado por MAT positivo. Además, el ensayo no dio ningún resultado falso positivo.

Este estudio sugiere que la qPCR es útil durante la primera semana de la enfermedad clínica y que las muestras de suero pueden ser mejores que las de sangre total para el diagnóstico.

La qPCR con SYBR Green es un método rápido, específico y menos costoso que el ensayo TaqMan para su uso en laboratorios que procesan una cantidad relativamente grande de muestras y tienen limitaciones de financiación (Agampodi, Matthias, Moreno y Vinetz, 2012; Bourhy *et al.*, 2011).

La identificación de los aislamientos recuperados fue posible con una combinación de técnicas moleculares, y podría precisarse más con sueros absorbidos no disponibles en nuestro laboratorio hasta el momento. Fue cumplida con los procedimientos descritos con anterioridad en el libro. La técnica de RAPD-PCR fue la primera ensayada (Ifrañ, 2006) y cumplió con las condiciones apropiadas para la caracterización de serovares de *Leptospira*. Se evaluaron cepas de colección y un aislamiento inicial. Se verificó que los patrones de bandas de amplificación eran idénticos o muy similares para algunos serovares, con determinadas condiciones y cebadores, pero eran claramente diferentes para otros y era posible la caracterización precisa del aislamiento en estudio. Se observó que la técnica de RAPD-PCR fue reproducible para *Leptospira*, ya que se obtuvo el mismo perfil genético para cada serovar en sucesivos ensayos con un mismo cebador. Se concluyó que es un método simple, rápido y útil para caracterizar por primera vez una cepa aislada de *Leptospira*. No es necesaria la purificación de ADN, pero sí lo es a partir de un cultivo puro, condición que no es de sencillo cumplimiento. En esta línea de trabajo, se ensayaron y pusieron en práctica luego otras técnicas de amplificación de secuencias repetitivas propias del género (MLVA-VNTR) (figura 15) (Meny *et al.*, 2017) que tienen más amplio respaldo de estandarización internacional y otras técnicas de fingerprinting complementarias como PFGE (figura 16). Fueron aplicadas al estudio de otras cepas de origen humano y de los aislamientos obtenidos en vacunos y otros animales, como fue descrito.

Sin perjuicio del valor y la importancia epidemiológica del trabajo cumplido, el aislamiento y la identificación en Uruguay de las cepas circulantes de *Leptospira* en personas, animales y el ambiente debe continuar, multiplicarse y perfeccionarse para obtener un panorama confiable sobre la distribución y difusión de las variantes bacterianas para guía consecuente de diversas acciones preventivas.

Sobre aspectos clínicos y epidemiológicos de la leptospirosis humana, su vinculación con el reservorio animal en sus principales componentes. Características de las cepas recuperadas

A comienzos de siglo, la leptospirosis humana probablemente no era una enfermedad emergente en Uruguay, sino una infección desatendida, favorecida por el contacto estrecho entre seres humanos y animales derivado de condiciones sociales y económicas (Repiso *et al.*, 2005). En la actualidad, se la define como una enfermedad endémica con entre cincuenta y cien casos detectables por año, con brotes esporádicos cada cierto tiempo.

Antes del año 2000, las infecciones por *Leptospira* eran una preocupación para veterinarios y personas involucradas en la producción de carne y lácteos, debido a los frecuentes abortos bovinos, la disminución de la producción de leche y las pérdidas económicas.

Las herramientas de diagnóstico estaban diseñadas para detectar infecciones animales, pero no estaban disponibles en la mayoría de los centros de salud locales para el estudio de los casos humanos. La MAT para sueros humanos se practicaba en los laboratorios de la Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, cuyos técnicos promovieron nuestra inclusión en el tema.

Los casos informados eran escasos y la letalidad aparente era alta. En 1998 se registraron trece casos humanos y tres muertes por el Departamento de Epidemiología del MSP; en 1999 se registraron ocho pacientes con leptospirosis y ninguna muerte. Es probable que se debiera a que solo los casos severos eran identificados, atendidos y denunciados (Lombardi, Varela de Sandler, Witkind, Petruccielli y Campalans, 1972; Ursu y Lombardi, 1993; Lombardi, 1997).

La vigilancia y el registro de casos, la preocupación de los trabajadores de la salud, la detección de infecciones menos graves, la promoción y difusión de información sobre el tema y la amplia oferta diagnóstica han contribuido al mejor conocimiento de esta infección, al diagnóstico en etapas precoces de la evolución clínica y a una reducción significativa de la mortalidad en nuestro medio (Filippini *et al.*, 2002).

Sin embargo —y aunque publicaciones locales han informado de casos de leptospirosis que muestran manifestaciones respiratorias, neurológicas e incluso abdominales, así como otros signos y síntomas—, su presencia ha sido causa de fallas diagnósticas y lo sigue siendo en la actualidad. El personal sanitario, sobre todo los médicos, debemos avanzar en el reconocimiento de las manifestaciones proteiformes de la leptospirosis y en la relación clínica de las presentaciones con la evolución más probable de los pacientes (Breijo, Servioli, De León, Mencía, Piñeyrúa y Zimalkovski, 2006; Pisano, Marra, Pomi y Boero, 1997; Filippini *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2019).

Más en general, el conocimiento sobre esta zoonosis, su epidemiología, su manejo, tratamiento y prevención están todavía insuficientemente difundidos entre el personal de salud y sus distintos técnicos, por lo que este es un deber pendiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República y del propio Sistema Nacional Integrado de Salud. Esto motivó la encuesta que hemos expuesto, llevada a cabo en 2015 por un grupo de estudiantes de Medicina, que verificó un nivel general de saberes satisfactorio de médicos y veterinarios sobre la leptospirosis, pero una dificultad del grupo de médicos para reconocer la diversidad del reservorio animal y para definir las vías de transmisión de la infección al ser humano.

Los resultados que presentamos sobre la situación de esta zoonosis en nuestro país se basan principalmente en MAT (WHO-ILS, 2003). Revelan un promedio de noventa a cien infecciones confirmadas por año. A partir de los resultados obtenidos por IFI-IgM, la cifra real podría ser superior a ciento veinte casos anuales.

Considerando que la población total del país en 2012 era de alrededor de 3.350.000 habitantes, que no todos los pacientes se estudian o notifican y que muchos casos leves ocurren en general por cada persona abierta o clínicamente enferma, pudimos estimar que al menos 500 infecciones humanas al año pudieron desarrollarse en Uruguay: una incidencia de leptospirosis humana de alrededor de 15 casos cada 100.000 habitantes al año. En comparación con estimaciones similares en otros países, esta representó una cifra alta para Uruguay (Jansen *et al.*, 2005; Vieira, Gama-Simões y Collares-Pereira, 2006; Schneider *et al.*, 2017).

La variación anual de la tasa de incidencia estuvo muy relacionada con el clima, la lluvia y las inundaciones que favorecen la diseminación de gérmenes de procedencia urinaria (figura 5), que explicarían los picos de 2002-2003, 2007, 2010 y 2014, por ejemplo, pero otros factores también son importantes. En 2004 y parte de 2005 las cifras de precipitaciones fueron elevadas, aunque la incidencia cayó abruptamente, quizá porque en 2002 la crisis económica regional llevó a que los productores rurales sacrificaran los animales más viejos, lo que disminuyó de manera importante el volumen del reservorio animal.

Doce millones de bovinos y 9.500.000 de ovinos rumiantes vivían en campos uruguayos en 2008, a la par de una gran población de canes (alrededor de 1.200.000), unos 350.000 equinos e innumerables roedores de diversas especies. Es probable que la frecuencia de infección sea alta para bovinos y equinos, aunque resta confirmar la prevalencia en otras especies. El componente bovino del reservorio de leptospirosis ya ha sido estudiado, a escala local y mundial, y se ha reportado su importancia en Uruguay (Repiso *et al.*, 2005; Puentes *et al.*, 2011; Zarantonelli *et al.*, 2018). La eliminación de *Leptospira* a partir de la orina de estos animales infectados y el contacto frecuente con ellos declarado por los pacientes positivos orientan a considerar

su relevancia en el origen de las infecciones humanas. Su distribución territorial y la observación de las condiciones de vida y trabajo de la población rural afectada —por ejemplo, falta de protección adecuada de los trabajadores jóvenes en tambos y predios ganaderos; exposición a la orina animal, a fetos abortados y a tejidos reproductivos infectados; eliminación del agua de lavado de áreas de trabajo a colecciones próximas de agua, lo que favorece la recirculación de bacterias— conducen a señalar a los animales de producción, en especial bovinos, como la principal fuente directa de leptospirosis humana en nuestro país. La exposición de los trabajadores es especialmente importante en granjas lecheras, como lo confirma la elevada seroprevalencia de anticuerpos específicos hallada en este grupo humano de riesgo y también en otros trabajadores rurales como los arroceros.

Nuestros resultados de estudio de grupos humanos en riesgo (Meny *et al.*, 2019) confirman que el contacto de los seres humanos con animales es un factor de riesgo importante para desarrollar infección por *Leptospira*, al menos en algunos grupos sociales definidos. La mayoría de los miembros de los grupos humanos estudiados (trabajadores de tambos, de arroceras, recicladores de residuos urbanos, veterinarios, habitantes de asentamientos) estuvieron expuestos a varios de los factores de riesgo conocidos. La exposición directa o indirecta a animales y el uso de agua no potable fueron las condiciones más relevantes asociadas con la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*.

Los títulos frecuentes de Canicola en los habitantes de los barrios marginales coincidieron con los de la población cercana y numerosa de perros que viven en dicho entorno.

La reactividad de los sueros equinos estudiados fue alta (50%) (tabla 12) en este programa de estudio, y también en nuestros datos preliminares de una encuesta más completa. El serogrupo Icterohaemorrhagiae fue el reactivo con más frecuencia en sueros de caballos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos regionales. Las infecciones y enfermedades de los caballos generan preocupación entre los criadores y propietarios. La enfermedad equina y el papel local de los caballos en la transmisión de *Leptospira* deben ser estudiados más a fondo (Khurana *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2017).

El contacto con roedores también fue identificado como un factor de riesgo importante para los grupos humanos estudiados. También puede serlo para otros animales, como lo sugieren nuestros datos y los expresados en la literatura internacional (Guernier, Goarant, Benschop y Lau, 2018; Fischer *et al.*, 2018; Cosson *et al.*, 2018), aunque los roedores no siempre se reconocen como reservorio relevante de estas infecciones (Biscornet *et al.*, 2017; Loan *et al.*, 2015; Allan *et al.*, 2018).

En nuestro medio, las ratas —y, en parte, los perros— son culpados habitualmente como fuente de leptospirosis humana por el personal de salud (Arriola *et al.*, 2015) y por la población en general, que no identifica a otros animales de producción o domésticos como posible origen de infección en

los cuales enfocar necesarias medidas preventivas. Sin embargo, y si bien no es posible ni prudente minimizar la participación de estos roedores en la difusión de la leptospirosis, esta no parece ser en nuestro medio la enfermedad de la rata, como es frecuente creer. La asociación más frecuente con la infección humana parece ser el contacto con animales de producción, en especial con bovinos.

Aunque resta estudiar de modo extenso las especies de roedores en el medio rural, datos preliminares en el área metropolitana señalan una reducida seroprevalencia de anticuerpos en ellas, e indican contacto y excreción de serogrupos no aislados localmente hasta el momento en infecciones humanas, sobre todo Icterohaemorrhagiae, como en roedores urbanos y suburbanos de Brasil, Argentina y de todo el mundo (Scialfa *et al.*, 2010; De Faria *et al.*, 2008; Boey *et al.*, 2019). Este serogrupo es considerado el principal causante de las infecciones graves por *Leptospira* en el ser humano, pero no ha sido aislado hasta el momento de los casos humanos en Uruguay, casos que ocurrieron en pacientes muy vinculados a la población bovina en tambos y predios rurales. Si se obtuvieran en adelante más aislamientos humanos y más cultivos de casos urbanos, quizá correspondieran, en parte, a esta variante procedente de roedores u otros animales. En el reducido conjunto de casos urbanos anuales no hay reactividad predominante en MAT para este serogrupo, pero es sabido que este dato no es confiable para distinguir la variante infectante.

La reactividad para Icterohaemorrhagiae en MAT fue, sin embargo, elevada en el relevamiento de contactos de grupos humanos en riesgo, que detectaba anticuerpos de probable alta afinidad de serogrupo.

L. interrogans Pomona Kennewicki y Canicola han sido aislados en infecciones bovinas y humanas, con perfiles genéticos parciales idénticos. Hay que señalar, no obstante, que hay variantes aisladas en infecciones bovinas (*L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. noguchii*) que no han sido recuperadas hasta el momento en infecciones humanas y que lo inverso ocurre con aislamientos humanos (*L. kirschneri*, por ejemplo) no cultivados en muestras bovinas.

La identificación de cepas humanas de *Leptospira* no ha sido publicada con frecuencia en informes de países vecinos. *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ha sido habitualmente identificada en centros urbanos de Brasil (Pereira *et al.*, 2000). Otras especies y serovares son probablemente comunes en áreas rurales y otras de Brasil, entre ellas *L. noguchii* (Silva *et al.*, 2009) y *L. kirschneri* (Da Cunha *et al.*, 2016; Balassiano *et al.*, 2017). *L. santarosai* ha sido aislada en Colombia y países vecinos (Peláez Sanchez *et al.*, 2016). *L. interrogans*, serogrupos Canicola, Sejroe, Icterohaemorrhagiae y otros, han sido aislados de seres humanos en Argentina (Chiani *et al.*, 2016).

En cuanto a los serogrupos bovinos aislados e identificados, *L. interrogans* Pomona Kennewicki es un patógeno animal reconocido al igual que *L.*

borgpetersenii Sejroe Hardjo, del cual los vacunos son hospederos de mantenimiento, pero *L. interrogans* Canicola Canicola, en cambio, ha sido solo identificado en nuestros estudios y en la región como variante infectante en carácter incidental. Merece especial atención el aislamiento reiterado de *L. noguchii*, que advierte sobre la circulación en nuestro medio de una especie no reconocida antes, que se debe incorporar de modo estable en las técnicas de diagnóstico indirecto como MAT y tener en cuenta en la formulación de vacunas al igual que el serovar Kennewicki. Además, su comportamiento como patógeno en la amplia población bovina nacional y su posible transmisión al ser humano deben ser objeto de estudio detallado y vigilancia.

Todos los factores de riesgo prevalentes identificados deben ser considerados para diseñar programas de prevención efectivos. El contacto frecuente con animales de producción, sobre todo bovinos, con caballos y perros empleados como auxiliares laborales están relacionados de forma estrecha con las actividades económicas nacionales predominantes, y parece ser la principal razón que explica la incidencia relativamente alta de leptospirosis en los trabajadores rurales de Uruguay. Las malas condiciones ambientales y sociales, junto con el contacto con perros, equinos y roedores, son también factores de riesgo importantes en algunos grupos humanos suburbanos y además en entornos rurales.

Los limitados resultados obtenidos sobre la vinculación de las infecciones humanas con las correspondientes al reservorio animal en nuestro medio proveen orientaciones importantes de conocimiento, pero muestran también que falta mucho por saber y que se requiere profundizar en la investigación epidemiológica, el aislamiento más numeroso y la comparación de cepas humanas y animales, para colocarse en condiciones de diseñar medidas preventivas más eficaces de control de la difusión de esta zoonosis, con enfoque *Una Salud* (Guernier *et al.*, 2018; Loureiro *et al.*, 2020; Schelotto *et al.*, 2013).

Durante años nuestro equipo ha desarrollado una campaña de información y educación en pequeños poblados, empresas rurales, tambos, centros educativos, profesionales y sanitarios, organizaciones comunitarias e incluso en servicios de educación superior (González y Del Monte, 2008) para contribuir al mejor conocimiento y alertar sobre esta zoonosis, su prevención, diagnóstico y manejo. Se requiere difundir la necesidad de tomar medidas preventivas para la protección de los grupos en riesgo mediante equipo adecuado de protección personal (guantes, botas, etc.), información, educación e inmunización vacuna, que indirectamente protege la población humana, como fue demostrado en Nueva Zelanda (Thornley, Baker, Weinstein y Maas, 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro relevamiento serológico sugieren que los seres humanos pertenecientes a todos los grupos en riesgo estudiados estuvieron expuestos a la infección por *Leptospira*. El porcentaje de muestras que revelaron anticuerpos fue superior al 40% en todos los grupos

examinados (tabla 11). Como se esperaba, la seroprevalencia fue menor entre otras personas no expuestas a factores de riesgo conocidos de infección, cuyas muestras se obtuvieron de forma ocasional. Resultados similares se han reportado en encuestas regionales e internacionales (Escandon-Vargas, Osorio y Astudillo-Hernández, 2017; Parveen *et al.*, 2016).

La incidencia mayor de la leptospirosis en varones es un hecho conocido y presente en todo el mundo. Se suele atribuir al diferente perfil ocupacional de uno y otro sexo y a las actividades de predominancia peridomiciliarias de las mujeres (Costa *et al.*, 2015). En Uruguay, las características laborales de los trabajadores rurales infectados parecen respaldar esta noción; sin embargo, nuestros relevamientos seroepidemiológicos sobre grupos sociales en riesgo revelan que las mujeres tienen contacto frecuente e infección por *Leptospira* (tabla 11), aunque no se enfermen en proporción similar a las infecciones (Meny P *et al.*, 2019). Estudios más recientes, respaldados en experiencias con animales, parecen confirmar que la resistencia a la enfermedad (aunque no a la infección) es mayor en el sexo femenino (Gomes, Guedes, Potula, Dellagostin y Gomes-Solecki, 2018).

Hay otras publicaciones que informan como la nuestra sobre frecuencias de infección —no enfermedad— similares o mayores en mujeres que en varones (Pedraza, Salamanca, Ramírez, Ospina y Pulido, 2012; García Masaya *et al.*, 2013; Escandón-Vargas *et al.*, 2017). Existe también bibliografía consultable sobre respuesta inmune diferencial de unas y otros a las infecciones virales, bacterianas y parasitarias, con mayor resistencia de las mujeres a la enfermedad, asimetría que se atribuye a efectos hormonales o a factores codificados en secuencias genómicas distintas según sexo (Klein y Roberts, 2010; Schurz *et al.*, 2019; Giefing-Kroll, Berger, Lepperdinger y Grubeck-Loebenstein, 2015). La mayor severidad de las infecciones por *Leptospira* en varones podría deberse a una menor capacidad de desarrollo de la respuesta inmune innata, lo cual impide un efectivo control temprano de la infección, seguido de una activación reducida de la respuesta inmune adaptativa, con proliferación microbiana en los tejidos y progreso de la enfermedad (Chin *et al.*, 2018).

Por el contrario, la baja incidencia de la leptospirosis clínica detectada en mujeres, a pesar de la infección frecuente, puede ser el resultado de un subdiagnóstico de la enfermedad o una demanda limitada de atención por parte de las pacientes. Esta explicación no está respaldada en la actualidad por pruebas existentes; sin embargo, merece un examen más detenido.

Es necesario analizar en detalle si los factores ligados al género están vinculados al desarrollo de enfermedad clínica. La respuesta del huésped está involucrada en la patogenia de esta enfermedad; puede comportarse de manera diferente en hombres o mujeres, así como en hombres jóvenes o pacientes ancianos (Zuerner, 2015).

Los contactos infecciosos se detectaron con mayor frecuencia en los miembros jóvenes de todos los grupos de riesgo (tabla 12) (Meny *et al.*, 2019) y en los casos con diagnóstico confirmado suele ocurrir una distribución por edades similar (Schelotto *et al.*, 2012). Niños y niñas rara vez muestran enfermedad, al tiempo que la leptospirosis fue menos frecuente en los grupos de edad avanzada, al igual que la reactividad sérica detectada, pero los casos graves ocurren con mayor frecuencia en los trabajadores mayores (Costa *et al.*, 2015; Meny *et al.*, 2017; Schelotto *et al.*, 2012). Se supone que el que los niños no enfermen con frecuencia es porque están menos expuestos en general, excepto a los perros y roedores en entornos urbanos o rurales poco favorecidos (Tealdo, Romero, Autrey y Samartino, 2007), pero corresponde también revisar estos criterios con datos concretos de contactos, infección y enfermedad. Se necesita más información sobre la presencia y transmisión de la leptospirosis en mujeres y niños, que rara vez se reconocen como infectados por razones que deben ser exploradas especialmente (Guerrier *et al.*, 2013).

Perspectivas

Sobre la secuencia pasada, presente y futura de las investigaciones

El trabajo que aquí se informa constituye una combinación de tareas de apoyo a la atención de salud, creación de conocimientos, formación de recursos humanos y su difusión por medio de actividades de enseñanza y extensión, como corresponde a todo equipo técnico y docente universitario del área de la salud.

El objetivo inicial de respaldo diagnóstico y desarrollo de conocimientos clínico-epidemiológicos sobre la leptospirosis humana requirió la incorporación y validación de herramientas y métodos diversos y la organización de una extensa red de colaboraciones interinstitucionales e interdisciplinarias que facilitaron la tarea. Dio lugar a resultados que incluyeron el descubrimiento de nuevas incógnitas a develar sobre el reservorio animal, las condiciones de riesgo de diversos grupos humanos y otras, en una secuencia que creemos inconclusa e interminable de conocimientos obtenidos que revelan nuevos aspectos y áreas de lo que falta saber y perseguir en etapas sucesivas de investigación.

El próximo camino exige reforzar la formación de técnicos e investigadores, la difusión de conocimientos a todos los niveles y la búsqueda de otros, nuevos, detectados como necesarios. El seguimiento a largo plazo de la evolución de los enfermos conocidos, el estudio detallado de otros grupos de riesgo, el análisis de la respuesta inmune diferencial en ambos sexos, el más amplio aislamiento de cepas obtenibles del ambiente y de personas o animales infectados, el desarrollo y validación de procedimientos sencillos de diagnóstico empleables en los primeros niveles de atención y la creación de conocimientos y productos que faciliten la necesaria elaboración de vacunas efectivas (Felix *et al.*, 2019; Nagel *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2019). Esto permitirá que se superen las presentes formulaciones basadas en bacterias inactivadas. Todos estos constituyen metas identificables de un proceso de conquista progresiva y en etapas de lo no sabido, que no debe tener fin.

Referencias

- ADLER, B. (2015). Vaccines Against Leptospirosis. En B. ADLER (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 251-272). Berlín: Springer Verlag.
- AGAMPUDI, S. B., MATTHIAS, M. A., MORENO, A. C., y VINETZ, J. M. (2012). Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction in Leptospirosis Diagnosis: Association of Level of Leptospiremia and Clinical Manifestations in Sri Lanka. *Clinical Infectious Diseases*, 54(9), 1249-1255. <https://doi.org/10.1093/cid/ciso35>
- AGUDELO-FLÓREZ, P., LONDOÑO, A. F., QUIROZ, V. H., ANGEL, J. C., MORENO, N., LOAIZA, E. T., y RODAS, J. D. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellin, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), 906-910. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0195>
- AHMED, N., DEVI, S. M., VALVERDE, M., VIJAYACHARI, MACHANG'U, R., ELLIS, W., y HARTSKEERL, R. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5(28) <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-11-5-2>
- ALLAN, K. J., HALLIDAY, J. E. B., MOSELEY, M., CARTER, R. W., AHMED, A., GORIS, M. G. A., y CLEAVELAND, S. (2018). Assessment of animal hosts of pathogenic *Leptospira* in northern Tanzania. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006444>
- ARICAPA, H. J., PÉREZ, J. E., CABRERA, I. C., y RIVERA, K. (2008). Valoración de la respuesta de anticuerpos tipo IgM e IgG frente a *Leptospira* en bovinos. Biosalud, 7(1), 29-39. Recuperado de <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/5828>
- ARRIOLA, N., BEROIS, D., JELDRES, M., LARA, F., y LEITES, M. (2015). *Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay, julio-setiembre 2015* (Monografía, Universidad de la República, Montevideo). <https://hdl.handle.net/20.500.12008/19200>
- BALASSIANO, I. T., VITAL-BRAZIL, J. M., RAMOS, T. M. V., TIMM, L. N., y PEREIRA, M. M. (2017). Molecular and serological characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Pomona isolated from a human case in a Brazilian rural area. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), 396-398. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0445-2016>
- BERTASIO, C., BONIOTTI, M. B., LUCCHESI, L., Ceglie, L., BELLINATI, L., MAZZUCATO, M., FURLANELLO, T., y NATALE, A. (2020). Detection of New *Leptospira* Genotypes Infecting Symptomatic Dogs: Is a New Vaccine Formulation Needed? *Pathogens*, 9(6). <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9060484>
- BETANCOR, L., SCHELOTTO, F., MARTINEZ, A., PEREIRA, M., ALGORTA, G., RODRÍGUEZ, M. A., y CHABALGOITY, J. A. (2004). Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates Collected from Humans and Poultry in Uruguay from 1995-2002. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1155-1162. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1155-1162.2004>
- BISCORNET, L., DELLAGI, K., PAGÈS, F., BIBI, J., de COMARMOND, J., MÉLADE, J., y TORTOSA, P. (2017). Human leptospirosis in Seychelles: A prospective study confirms the heavy burden of the disease but suggests that rats are not the main reservoir. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005831>

- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICALDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., ... y PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3(12), 757-771.
- BOEY, K., SHIOKAWA, K., y RAJEEV, S. (2019). *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>
- BOURHY, P., BREMONT, S., ZININI, F., GIRY, C., y PICARDEAU, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2154-2160. <https://doi.org/10.1128/jcm.02452-10>
- BOONSILP, S., THAIPADUNPANIT, J., AMORNCHAI, P., WUTHIEKANUN, V., BAILEY, M. S., HOLDEN, M. T., ... y PEACOCK, S. J. (2013). A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>
- BRAGA, J., HAMOND, C., MARTINS, G., ABREU, R. N., y LILENBAUM, W. (2011). Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 147-150.
- BRASELLI, A., SAVIO, E., y PURTSCHER, H. (Eds.) (1998). Enfermedades infecciosas. Montevideo: Oficina del Libro.
- BREIJO, M., SERVIOLI, L., DE LEÓN, A., MENCÍA, X., PIÑEYRÚA, M., y ZIMALKOVSKI, N. (2006). Leptospirosis con compromiso respiratorio predominante. Presentación de cinco casos clínicos. *Revista Médica del Uruguay*, 22(3), 220-225. Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902006000300009#2
- CAFFARENA, R. M., AGORIO, M., y BARRIOLA, J. (1966). Comprobaciones serológicas de brucelosis y leptospirosis en suinos de la República Oriental del Uruguay. *An Fac Vet.*, 11, 93-103.
- CAFFARENA, R. M., CACCHIONE, R. A., CASCELLI, E. S., y MARTÍNEZ, E. S. (1971). Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiología*, 9, 186-194.
- CAMERON, C. E. (2015). Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. En B. ADLER (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 21-42). Berlín: Springer Verlag.
- CÉSPEDES Z., M. (2005). Leptospirosis: Enfermedad zoonótica emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 290-307. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342005000400008&script=sci_abstract
- CÉSPEDES Z., M., TAPIA, R., BALDA, L., GONZALEZ, D., GLENNY, M., y VINETZ, J. M. (2009). Brote de leptospirosis asociado a la natación en una fuente de agua subterránea en una zona costera, Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4), 441-448. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v26n4/a05v26n4>
- CHIANI, y., JACOB, P., VARNI, V., LANDOLT, N., SCHMELING, M. F., PUJATO, N., CAIMI, K., y VANASCO, B. (2016). Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033>
- CHIN, V. K., LEE, T. Y., LIM, W. F., WAN SHAHRIMAN, Y. W. Y., SYAFINAZ, A. N., ZAMBERI, S., y MAHA, A. (2018). Leptospirosis in humans: Biomarkers of host immune responses. *Microbiological Research*, 207, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.015>

- COSSON, J. F., PICARDEAU, M., MIELCAREK, M., TATARD, C., CHAVAL, Y., SUPUTTAMONGKOL, Y., ... y MORAND, S. (2014). Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in southeast Asia. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8, e2902. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002902>
- COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSO, P., MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., y KO, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- DA CUNHA, C. E., FELIX, S. R., NETO, A. C., CAMPELLO-FELIX, A., KREMER, F. S., MONTE, L. G., ... y DELLAGOSTIN, O. A. (2016). Infection with *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok: First Report from the Southern Hemisphere. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), 519-521. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0505>
- DE FARIA, M. T., CALDERWOOD, M. S., ATHANAZIO, D. A., MCBRIDE, A. J., HARTSKEERL, R. A., PEREIRA, M. M., ... y REIS, M. G. (2008). Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica*, 108(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005>
- DE KATZ, K. N., ANANIN, V. V. (1971). *Leptospirosis humana y animal*. Moscú: Ed. Medicina.
- DIVERS, T. J., CHANG, Y. F., IRBY, N. L., SMITH, J. L., y CARTER, C. N. (2019). Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Veterinary Journal*, 51(3), 287-292. <https://doi.org/10.1111/evj.13069>
- ESCANDÓN-VARGAS, K., OSORIO, L., y ASTUDILLO-HERNÁNDEZ, M. (2017). Seroprevalence and factors associated with *Leptospira* infection in an urban district of Cali, Colombia. *Cadernos de Saúde Pública*, 33(5). <https://doi.org/10.1590/0102-311X00039216>
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., y PEROLAT, P. (2000). *Leptospira and Leptospirosis* (2.^a ed). Melbourne: MediSci.
- FELIX, C. R., SIEDLER, B. S., BARBOSA, L. N., TIMM, G. R., MCFADDEN, J., ALAN, J. A., y MCBRIDE, A. J. A. (2019). An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(2). <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508>
- FERNANDES, L. G. V., GUAMAN, L. P., VASCONCELLOS, S. A., HEINEMANN, M. B., PICARDEAU, M., y NASCIMENTO, A. L. T. O. (2019). Gene silencing based on RNA-guided catalytically inactive Cas9 (dCas9): a new tool for genetic engineering in *Leptospira*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37949-x>
- FILIPPINI, M., DEL MONTE, A., FLORES, K., PARADA, D., SCHELOTTO, F., HERNÁNDEZ, E., ... y LOBATO, L. (2002). Leptospirosis. Epidemiología y diagnóstico. En *Congreso Nacional de Medicina Interna*, Montevideo.
- FILIPPINI, M., PARADA, D., SCHELOTTO, F., ZAMPEDRI, L., y LOBATO, L. (2003). Leptospirosis. Epidemiología y diagnóstico. Florida. *Revista Médica de Florida*, 1, 5-8.
- FISCHER, B. M., McMULLEN JR., R. J., REESE, S., y BREHM, W. (2019). Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results. *BMC Veterinary Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1722-7>
- FISCHER, S., MAYER-SCHOLL, A., IMHOLT, C., SPIERLING, N. G., HEUSER, E., SCHMIDT, S., ... y ULRICH, R. G. (2018). *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(4), 188-199. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2140>

- FOUTS, D. E., MATTHIAS, M. A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D. E., ... y VINETZ, J. M. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>
- GALLOWAY, R. L., y LEVETT, P. N. (2010). Application and Validation of PFGE for Serovar Identification of *Leptospira* Clinical Isolates. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824>
- GARCÍA-GONZÁLEZ, R., REYES-TORRES, A., REYES-MONTES, M. D. R., DUARTE-ESCALANTE, E., FRÍAS-DE-LEÓN, M. G., RIVAS-SÁNCHEZ, B., y VELASCO-CASTREJÓN, O. (2019). Genotyping of *Leptospira interrogans* isolates from Mexican patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961026>
- GARCÍA MASAYA, M. L., HERRERA GARCÍA, M. E., PÉREZ VÁSQUEZ, A. M., CASTILLO SIGNOR, L. C., y KESTLER ORDÓÑEZ, R. O. (2013). Seroprevalencia de leptospirosis humana en un asentamiento del área urbana de la ciudad de Guatemala. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 65, 166-176. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So375-07602013000200003
- GEYMONAT, J. P. (2011). *Evaluación de métodos de laboratorio para el diagnóstico de leptospirosis humana* (Tesis de grado, Universidad de la República, Montevideo). <https://hdl.handle.net/20.500.12008/33854>
- GIEFING-KRÖLL, C., BERGER, P., LEPPERDINGER, G., y GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*, 14(3), 309-321. <https://doi.org/10.1111/accel.12326>
- GOMES, CH. K., GUEDES, M., POTULA, H. H., DELLAGOSTIN, O. A., y GOMES-SOLECKI, M. (2018). Sex Matters: Male Hamsters Are More Susceptible to Lethal Infection with Lower Doses of Pathogenic *Leptospira* than Female Hamsters. *Infection and Immunity*, 86(10). <https://doi.org/10.1128/iai.00369-18>
- GONZÁLEZ, S., y DEL MONTE, A. (2008). *Leptospira*. En G. ALGORTA et al., *Temas de bacteriología y virología médica*. Montevideo: Oficina del Libro.
- GONZÁLEZ, S., GEYMONAT, J. P., HERNÁNDEZ, E., MARQUÉS, J. M., SCHELOTTO, F., y VARELA, G. (2013). Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(12), 941-945. <https://doi.org/10.3855/jidc.4110>
- GORIS, M. G., KIKKEN, V., STRAETEMANS, M., ALBA, S., GOEIJENBIER, M., VAN GORP, E. C., ... y HARTSKEERL, R. A. (2013). Towards the burden of human leptospirosis: duration of acute illness and occurrence of post-leptospirosis symptoms of patients in the Netherlands. *Plos One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076549>
- GRILLOVÁ, L., y PICARDEAU, M. (2020). Core Genome Multi-locus Sequence Typing Analyses of *Leptospira* spp. Using the Bacterial Isolate Genome Sequence Database. En N. KOIZUMI y M. PICARDEAU (Eds.), *Methods in molecular biology* (vol. 2134, pp. 11-21).
- GRÜNE LÖFFLER, S., RAGO, V., MARTÍNEZ, M., UHART, M., FLORIN-CHRISTENSEN, M., ROMERO, G., y BRIHUEGA, B. (2015). Isolation of a Seawater Tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *Plos One*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144974>
- GRÜNE LÖFFLER, S., MARTÍNEZ, M., ROMERO, G., y BRIHUEGA, B. (2014). Test de aglutinación microscópica MAT. En *Manual: Curso teórico práctico de epidemiología y diagnóstico de leptospirosis* (pp. 16-20). Buenos Aires: Instituto de Patobiología, INTA Castelar.

- GUERNIER, V., GOARANT, C., BENSCHOP, J., y LAU, C. L. (2018). A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006503>
- GUERRIER, G., HIE, P., GOURINAT, A. C., HUGUON, E., POLFRIT, Y., GOARANT, C.,... y MISSOTTE, I. (2013). Association between Age and Severity to Leptospirosis in Children. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002436>
- GUGLIELMINI, J., BOURHY, P., SCHIETTEKATTE, O., ZININI, F., BRISSE, S., y PICARDEAU, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>
- HAAKE, D. A., y LEVETT, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. En B. ADLER (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 65-97). Berlín: Springer Verlag.
- HAAKE, D. A., SUCHARD, M. A., KELLEY, M. M., DUNDOO, M., ALT, D. P., y ZUERNER, R. L. (2004). Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *Journal of Bacteriology*, 186, 2818-2828.
- HAMOND, C., MARTINS, G., y LILENBAUM, W. (2012). Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1927-1930.
- HAMOND, C., PESTANA, C. P., ROCHA-DE-SOUZA, C. M., CUNHA, L. E., BRANDÃO, F. Z., MEDEIROS, M. A., y LILENBAUM, W. (2015). Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), 264-269. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.014>
- HARRISON, N. A., y FITZGERALD, W. R. (1988). Leptospirosis –can it be a sexually transmitted disease? *Postgraduate Medical Journal*, 64(748), 163-164.
- HARTSKEERL, R. A., GORIS, M. G. A., BREM, S., MEYER, P., KOPP, H., GERHARDS, H., y WOLLANKE, B. (2004). Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51, 110-115. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00740.x>
- HEM, S., LY, S., VOTSI, I., VOGT, F., ASGARI, N., BUCHY, P.,... y TARANTOLA, A. (2016). Estimating the Burden of Leptospirosis among Febrile Subjects Aged below 20 Years in Kampong Cham Communities, Cambodia, 2007-2009. *Plos One*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151555>
- HULL-JACKSON, C., GLASS, M. B., ARI, M. D., BRAGG, S. L., BRANCH, S. L., WHITTINGTON, C. U., ... y LEVETT, P. N. (2006). Evaluation of a Commercial Latex Agglutination Assay for Serological Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1853-1855. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1853-1855.2006>
- IFRAN, S. (2006). *Cultivo de Leptospira y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR: Amplificación al azar de ADN polimórfico* (Tesina de grado, Universidad de la República, Montevideo).
- IGLESIAS, T., MENY, P., MENÉNDEZ, C., ASHFIELD, N., QUINTERO, J., SCHELOTTO, F., y VARELA, G. (2018). Comportamiento de un test inmunocromatográfico comercial para el diagnóstico de leptospirosis. En *XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología*. ALAM, Santiago de Chile.
- JAEGER, L. H., MORENO, L. Z., KREMER, F. S., DELLAGOSTIN, O. A., MORENO, A. M., y LILENBAUM, W. (2019). Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa UC5/2011, a strain isolated after mare abortion: Implications for genital animal leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 7-9. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.01.019>

- JANSEN, A., SCHÖNEBERG, I., FRANK, C., ALPERS, K., SCHNEIDER, T., y STARK, K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerging Infectious Diseases*, 11(7), 1048-1054. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041172>
- JAYAKRISHNAN, B., BEN ABID, F., BALKHAIR, A., ALKAABI, J. K., AL-RAWAS, O. A., GEORGE, J., y AL-ZEEDY, K. (2013). Severe Pulmonary Involvement in Leptospirosis: Alternate antibiotics and systemic steroids. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 13, 318-322.
- KATELARIS, A. L., GLASGOW, K., LAWRENCE, K., CORBEN, P., ZHENG, A., SUMITHRA, S., ... y MCANULTY, J. (2020). Investigation and response to an outbreak of leptospirosis among raspberry workers in Australia, 2018. *Zoonoses Public Health*, 67, 35-43.
- KATZ, K. N., y ANANIN, V. V. (1971). *Leptospirosis humana y animal*. Moscú: Ed. Medicina.
- KHURANA, S., DHAMA, K., PRASAD, M., GULATI, B., MALIK, Y., y KARTHIK, K. (2016). Leptospirosis in horses: special reference to equine recurrent uveitis. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4, 124-131. [http://dx.doi.org/10.18006/2016.4\(Spl-4-EHIDZ\).S123.S131](http://dx.doi.org/10.18006/2016.4(Spl-4-EHIDZ).S123.S131)
- KLEIN, S. L., y ROBERTS, C. W. (Eds.) (2010). *Sex Hormones and Immunity to Infection*. Berlín: Springer Verlag.
- LEPTOSPIRACEAE (s. f.) *Taxonomy Browser*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=170&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=unlock>
- LEVETT, P. N. (2015). Systematics of *Leptospiraceae*. En B. ADLER (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 11-20). Berlín: Springer-Verlag.
- LILENBAUM, W., y MARTINS, G. (2014). Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transboundary Emerging Diseases*, 61(1), 63-68.
- LOAN, H. K., VAN CUONG, N., TAKHAMPUNYA, R., KIET, B. T., CAMPBELL, J., THEM, L. N., ... y CARRIQUE-MAS, J. J. (2015). How Important are Rats as Vectors of Leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(1), 56-64. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1613>
- LOMBARDI, R. (1997). Acute Renal Failure in Leptospirosis in Uruguay. *Renal Failure*, 19(2), 315-318. <https://doi.org/10.3109/08860229709026295>
- LOMBARDI, R., VARELA DE SANDLER, A., WITKIND, J., PETRUCELLI, D., y CAMPALANS, L. A. (1972). Insuficiencia renal aguda en la Leptospirosis. *Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiología*, 10, 28-36.
- LOUREIRO, A. P., y LILENBAUM, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- LOUREIRO, A. P., JAEGER, L. H., DI AZEVEDO, M. I. N., MIRAGLIA, F., MORENO, L. Z., MORENO, A. M., y LILENBAUM, W. (2020). Molecular epidemiology of *Leptospira noguchii* reveals important insights into a One Health context. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 276-283. <https://doi.org/10.1111/tbed.13349>
- MASON, M. R., ENCINA, C., SREEVATSAN, S., y MUÑOZ-ZANZI, C. (2016). Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004895>
- MATTHIAS, M. A., RICALDI, J. N., CESPEDES, M., DIAZ, M. M., GALLOWAY, R. L., SAITO, M., y VINETZ, J. M. (2008). Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000213>

- MAZE, M. J., SHARPLES, K. J., ALLAN, K. J., RUBACH, M. P., y CRUMP, J. A. (2019). Diagnostic accuracy of leptospirosis whole-cell lateral flow assays: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(4), 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.014>
- MENY, P., HERNÁNDEZ, E., SCHELOTTO, F., y VARELA, G. (2014). Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IFI-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. *Revista Médica del Uruguay*, 30, 88-92.
- MENY, P., MENÉNDEZ, C., QUINTERO, J., HERNÁNDEZ, E., RÍOS, C., BALASSIANO, I. T., ... y VARELA, G. (2017). Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59(79). <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759079>
- MENY, P., MENÉNDEZ, C., ASHFIELD, N., QUINTERO, J., RÍOS, C., IGLESIAS, T., ... y VARELA, G. (2019). Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.005>
- MGOGE, G. F., MHAMPHI, G. G., KATAKWEBWA, A. S., y THOMAS, M. (2014). *Leptospira* infections in freshwater fish in Morogoro Tanzania: a hidden public health threat. *Tanzania Journal of Health Research*, 16(2), 112-117. <https://doi.org/10.4314/thrb.v16i2.7>
- MGOGE, G. F., MACHANG'U, R. S., MHAMPHI, G. G., KATAKWEBWA, A., MULUNGU, L. S., DURNER, L., y BELMAIN, S. R. (2015). *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates and Reservoir Hosts. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>
- MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (2018, julio 3). Guía Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/guia-nacional-vigilancia-control-enfermedades-eventos-sanitarios>
- MIRAGLIA, F., DE MORAIS, Z. M., DELLAGOSTIN, O. A., SEIXAS, F. K., FREITAS, J. C., ZACARIAS, F. G., ... y MORENO, A. M. (2013). Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), 117-121. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0181-6>
- MORGAN, J., BORNSTEIN, S. L., KARPATI, A. M., BRUCE, M., BOLIN, C. A., AUSTIN, C. C., ... y TAPPERO, J. W. (2002). Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clinical Infectious Diseases*, 34(12), 1593-1599.
- MUNOZ-ZANZI, C., GROENE, E., MORAWSKI, B. M., BONNER, K., COSTA, F., BERTHERAT, E., y SCHNEIDER, M. C. (2020). A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970-2012. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44(78). <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.78>
- MURRAY, C. K., GRAY, M. R., MENDE, K., PARKER, T. M., SAMIR, A., RAHMAN, B. A., y PIMENTEL, G. (2011). Use of patient-specific *Leptospira* isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(4), 209-213. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.12.004>
- NAGEL, A., VÁZQUEZ, C. L., ETULAIN, J., BLANCO, F. C., GRAVISACO, M. J., GÓMEZ, R. M., y CAIMI, K. (2019). Bovine macrophages responses to the infection with virulent and attenuated *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Veterinary Microbiology*, 233, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.033>

- PANAPHUT, T., DOMRONGKITCHAIPORN, S., y THINKAMROP, B. (2002). Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, 6(1), 52-59. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(02\)90137-2](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(02)90137-2)
- PANAPHUT, T., DOMRONGKITCHAIPORN, S., VIBHAGOL, A., THINKAMROP, B., y SUSAENGRAT, W. (2003). Ceftriaxone Compared with Sodium Penicillin G for Treatment of Severe Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 36(12), 1507-1513. <https://doi.org/10.1086/375226>
- PAPPACHAN, M. J., MATHEW, S., ARAVINDAN, K. P., KHADER, A., BHARGHAVAN, P. V., KAREEM, M. M., y BATRA, H. V. (2004). Risk factors for mortality in patients with leptospirosis during an epidemic in northern Kerala. *National Medical Journal of India*, 17(6), 240-242.
- PARVEEN, S. M., SUGANYAA, B., SATHYA, M. S., MARGREAT, A. A., SIVASANKARI, K., SHANMUGHAPRIYA, S., ... y NATARAJASEENIVASAN, K. (2016). Leptospirosis Seroprevalence Among Blue Metal Mine Workers of Tamil Nadu, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), 38-42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0095>
- PEDRAZA, A. M., SALAMANCA, E. E., RAMÍREZ, R. Y., OSPINA, J. M., y PULIDO, M. O. (2012). Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en trabajadores de plantas de sacrificio animal en Boyacá, Colombia. *Infectio*, 16(1), 31-36. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=So123-93922012000100006&script=sci_abstract
- PELÁEZ SANCHEZ, R. G., LOPEZ, J. Á., PEREIRA, M. M., ARBOLEDA NARANJO, M., y AGUDELO-FLÓREZ, P. (2016). Genetic diversity of *Leptospira* in northwestern Colombia: first report of *Leptospira santarosai* as a recognised leptospirosis agent. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(12), 737-744. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160245>
- PEREIRA, M. M., MATSUO, M. G., BAUAB, A. R., VASCONCELOS, S. A., MORAES, Z. M., BARANTON, G., y SAINT GIRON, I. (2000). A Clonal Subpopulation of *Leptospira interrogans* Ssensu Stricto Is the Major Cause of Leptospirosis Outbreaks in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 450-452. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.450-452.2000>
- PEREZ, J., y GOARANT, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>
- PETRAKOVSKY, J., BIANCHI, A., FISUN, H., NÁJERA-AGUILAR, P., y PEREIRA, M. M. (2014). Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002-2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(10), 10770-10789. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010770>
- PICARDEAU M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- PINTO, P. S., LIBONATI, H., y LILENBAUM, W. (2017). A systematic review of leptospirosis in dogs, pigs, and horses in Latin America. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2), 231-238. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1201-8>
- PISANO, I., MARRA, A., POMI, A., y BOERO, A. (1997). Leptospirosis con compromiso miocárdico. *Cuadernos de Medicina Interna*, 1, 51-55.
- POSTIC, D., RIQUELME-SERTOUR, N., MERIEN, F., PEROLAT, P., y BARANTON, G. (2000). Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Research in Microbiology*, 151(5), 333-341. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00156-X)

- PRADUTKANCHANA, S., PRADUTKANCHANA, J., y KHUNTIKIJ, P. (2003). Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 86(7), 641-646.
- PUENTES, R., HERNÁNDEZ, E., FRANCO, G., CATTÁNEO, M., FURTADO, A., ROSADILLA, D., y BERMÚDEZ, J. (2011). Anticuerpos anti *Leptospira* en bovinos de pequeños productores lecheros de Uruguay. En *XV Congreso Latinoamericano de Buiatría*, Paysandú.
- RELLER, M. E., WUNDER, E. A. JR, MILES, J. J., FLOM, J. E., MAYORGA, O., WOODS, C. W.,... MATUTE, A. J. (2014). Unsuspected leptospirosis is a cause of acute febrile illness in Nicaragua. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002941>
- REPISO, M. V., GIL, A., BAÑALES, P., D'ANATRO, N., FERNÁNDEZ, L., GUARINO, H., ... y SILVA, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 40(157), 5-28. Recuperado de <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/368>
- RICARDO, T., JACOB, P., CHIANI, Y., SCHMELING, M. F., CORNEJO, P., OJEDA, A. A., ... y PREVITALI, M. A. (2020). Seroprevalence of leptospiral antibodies in rodents from riverside communities of Santa Fe, Argentina. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 14(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008222>
- ROSA, M. I., REIS, M. F. D., SIMON, C., DONDOSSOLA, E., ALEXANDRE, M. C., COLONETTI, T., y MELLER, F. O. (2017). IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(12), 4001-4012. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172212.14112016>
- SALAÜN, L., MÉRIEN, F., GURIANOVA, S., BARANTON, G., y PICARDEAU, M. (2006). Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3954-3962. <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06>
- SCHELOTTO, F., HERNÁNDEZ, E., GONZÁLEZ, S., DEL MONTE, A., IFRAN, S., FLORES, K., ... y VARELA, G. (2012). A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(2), 69-75. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652012000200003>
- SCHELOTTO, F., HERNÁNDEZ, E., VARELA, G., DEL MONTE, A., MENY, P., GONZÁLEZ, S., ... y GEYMONAT, J. P. (2013). Leptospirosis humana como zoonosis y su control. En ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA y ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA, *Leptospirosis*. Montevideo: Academia Nacional de Medicina y Academia Nacional de Veterinaria.
- SCHNEIDER, A. G., CASANOVAS-MASSANA, A., HACKER, K. P., WUNDER, E. A., JR, BEGON, M., REIS, M. G., ... y KO, A. I. (2018). Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415>
- SCHNEIDER, M. C., LEONEL, D. G., HAMRICK, P. N., DE CALDAS, E. P., VELÁSQUEZ, R. T., MENDIGAÑA PAEZ, F. A., ... y ALDIGHERI, S. (2017). Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data. *Pan American Journal of Public Health*, 41(81). <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.81>
- SCHURZ, H., SALIE, M., TROMP, G., HOAL, E. G., KINNEAR, C. J., y MÖLLER, M. (2019). The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Human Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0185-z>
- SCIALFA, E., BOLPE, J., BARDÓN, J. C., RIDAO, G., GENTILE, J., y GALLICCHIO, O. (2010). Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 126-128. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213014892012.pdf>

- SILVA, E. F., CERQUEIRA, G. M., SEYFFERT, N., SEIXAS, F. K., HARTWIG, D. D., ATHANAZIO, D. A.,... y DELLAGOSTIN, O. A. (2009). *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 621-623. <https://doi.org/10.3201/eid1504.071669>
- SILVA, H. R., TANAJURA, G. M., TAVARES-NETO, J., GOMES, M. L. C., LINHARES, A. C., VASCONCELOS, P. F., y KO, A. I. (2002). Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* in children of Salvador, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(2), 159-165. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/%5BAseptic-meningitis-syndrome-due-to-enterovirus-and-Silva-Tanajura/dfebo62fad4fcdodae2a44257d22ac37ab91916>
- SIQUEIRA, C. C., FRAGA, D. B. M., CHAGAS-JUNIOR, A. D., ATHANAZIO, D. A., SILVA, M. M. N., CERQUEIRA, R. B., ... y AYRES, M. C. C. (2020). Seroprevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in the metropolitan region of Salvador and Recôncavo Baiano region, Bahia state (NE Brazil). *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01956-5>
- SMITH, S., LIU, Y. H., CARTER, A., KENNEDY, B. J., DERMEDGOGLOU, A., POULGRAIN, S. S., ... y HANSON, J. (2019). Severe leptospirosis in tropical Australia: Optimising intensive care unit management to reduce mortality. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007929>
- SMYTHE, L. D., WUTHIEKANUN, V., CHIERAKUL, W., SUPUTTAMONGKOL, Y., TIENGRIM, S., DOHNT, M. F., ... y PEACOCK, S. J. (2009). The Microscopic Agglutination Test (MAT) is an Unreliable Predictor of Infecting *Leptospira* Serovar in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 695-697. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0252>
- SOARES, P. M., GOMES, D. O., MACEDO, F. P., SOARES, M. M., LEMES, K. R., JAEGER, L. H., ... y LIMA, A. M. C. (2020). Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in Brazil. *Microbial pathogenesis*, 138, 103803. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103803>
- STODDARD, R. A., GEE, J. E., WILKINS, P. P., MCCAUSTLAND, K., y HOFFMASTER, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- SUEPAUL, S. M., CARRINGTON, C. V., CAMPBELL, M., BORDE, G., y ADESIYUN, A. A. (2010). Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiology and infection*, 138(7), 1059-1070. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990902>
- TARANTOLA, A., y GOARANT, C. (2018). Leptospirosis in French Historical Medical Literature: Weil's Disease or Kelsch's Disease? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(6), 1366-1368.
- TEALDO, M. S., ROMERO, G. N., AUTREY, C. D., y SAMARTINO, L. (2007). *Serología positiva a Leptospira interrogans, serovar Cynopteri en caninos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. InVet.*, 9, 59-65.
- THAIPADUNPANIT, J., CHIERAKUL, W., WUTHIEKANUN, V., LIMMATHUROTSAKUL, D., AMORNCHAI, P., BOONSLIP, S.,... y PEACOCK, S. J. (2011). Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipL32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *Plos One*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236>
- THIBEAUX, R., IRAOLA, G., FERRÉS, I., BIERQUE, E., GIRAULT, D., SOUPÉ-GILBERT, M. E., ... y Goarant, C. (2018a). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, 4(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>

- THIBEAUX, R., GIRAULT, D., BIERQUE, E., SOUPÉ-GILBERT, M.-E., RETTINGER, A., DOUYÈRE, A., ... y GOARANT, C. (2018b). Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>
- THORNLEY, C. N., BAKER, M. G., WEINSTEIN, P., y MAAS, E. W. (2002). Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiology and Infection*, 128(1), 29-36. <https://doi.org/10.1017/S0950268801006392>
- TIMONEY, J. F., KALIMUTHUSAMY, N., VELINENI, S., DONAHUE, J. M., ARTIUSHIN, S. C., y FETTINGER, M. (2011). A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4), 349-353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.049>
- TORGERSON, P. R., HAGAN, J. E., COSTA, F., CALCAGNO, J., KANE, M., MARTINEZ-SILVEIRA, ... y ABELA-RIDDER, B. (2015). Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122>
- TORTEN, M., SHENBERG, E., y VAN DER HOEDEN, J. (1966). The Use of Immunofluorescence in the Diagnosis of Human Leptospirosis by a Genus-Specific Antigen. *The Journal of Infectious Diseases*, 116(5), 537-543. <https://doi.org/10.1093/infdis/116.5.537>
- TRUEBA, G., ZAPATA, S., MADRID, K., CULLEN, P., y HAAKE, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*, 7(1), 35-40.
- URUGUAY (2011, junio 23). Decreto n.º 210/011. Recuperado de <https://www.impco.com.uy/bases/decretos-originales/210-2011>.
- URSU, M., y LOMBARDI, R. (1993). Insuficiencia renal aguda en la leptospirosis: análisis de 20 casos. *Paciente Crít*, 6, 129-135.
- VANASCO, N. B., STIEFEL, M. L., VARELA ERNIAGA, S., y FRITSCHY, B. A. (2005). Brote de leptospirosis humana: análisis espacial de casos y variedades de leptospirosis. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica*. Recuperado de <https://www.siiisalud.com/des/expertoimpreso.php/69530>.
- VERMA, A., y STEVENSON, B. (2012). Leptospiral Uveitis –There Is More to It Than Meets the Eye! *Zoonoses and Public Health*, 59(2), 132-141. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01445.x>
- VIEIRA, M. L., GAMA-SIMÕES, M. J., y COLLARES-PEREIRA, M. (2006). Human leptospirosis in Portugal: A retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(5), 378-386. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.07.006>
- WAGENAAR, J. F., GORIS, M. G., PARTININGRUM, D. L., ISBANDRIO, B., HARTSKEERL, R. A., BRANDJES, D. P., y VAN GORP, E. C. (2010). Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Tropical Medicine & International Health*, 15(2), 152-159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02434.x>
- WEYANT, R. S., BRAGG, S. L., KAUFMANN, A. F. (2002). *Leptospira* and *Leptonema*. En P. R. MURRAY, E. J. BARON, M. A. PFALLER, F. C. TENOVER, R. H. YOLKEN (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 739-745). Washington D. C.: ASM. 6.ª ed.
- WHO-ILS (International Leptospirosis Society) (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta: WHO. Recuperado de https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- WUTHIEKANUN, V., CHIERAKUL, W., LIMMATHUROTSAKUL, D., SMYTHE, L. D., SYMONDS, M. L., DOHNT, M. F., ... y PEACOCK, S. J. (2007). Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1363-1365. <https://doi.org/10.1128/JCM.02430-06>
- XU, Y., y YE, Q. (2018). Human leptospirosis vaccines in China. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(4), 984-993. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1405884>
- YERSIN, C., BOVET, P., MÉRIEN, F., CLEMENT, J., LAILLE, M., VAN RANST, M., y PEROLAT, P. (2000). Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 71-76.
- ZAKI, S. A., y SHANBAG, P. (2010). Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. *Infection*, 38, 285-291. <https://doi.org/10.1007/s15010-010-0030-3>
- ZARANTONELLI, L., SUANES, A., MENY, P., BURONI, F., NIEVES, C., SALABERRY, X., y BUSCHIAZZO, 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. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>
- ZUERNER, R. L. (2005). Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. En R. Coico (Ed.), *Current Protocols in Microbiology* (pp 11-13). Nueva York: John Wiley.
- (2015). Host response to *Leptospira* infection. Immune pathology. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and leptospirosis: Current topics in microbiology and immunology* (vol. 387). Berlín: Springer Verlag.

Este libro es una construcción colectiva, que pretende dar visibilidad a un problema sanitario como es la leptospirosis humana, enfermedad zoonótica, con amplio reservorio animal, con sintomatología variable y poco atendida a nivel mundial.

Describe una combinación de tareas realizadas por el grupo de investigadores participante de apoyo a la atención de salud, creación de conocimientos, formación de recursos humanos y de difusión por medio de actividades de enseñanza y extensión. Muestra resultados que incluyen el descubrimiento de nuevas incógnitas a develar sobre el reservorio animal, las condiciones de riesgo de diversos grupos humanos, en una secuencia que creemos inconclusa e interminable de conocimientos obtenidos, que revelan nuevos aspectos y áreas de lo que falta saber y perseguir en etapas sucesivas de investigación.

Es un libro destinado a todo el personal de salud y sobre todo a las personas que se están formando en el área.