



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN
ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DEL URUGUAY.**

Dra. Alejandra Suanes Martínez DMTV MSA

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2025

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN
ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DEL URUGUAY.**



Dr. Andrés D. Gil Rodríguez DMV, MSc, PhD

Director de Tesis



ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

Materia: PHD01 TESIS DE DOCTORADO

Orientación: Salud Animal

Período: MARZO 2025

Fecha Evaluación: 25/03/2025 Hora: 09:00 hs Lugar: Salón 101 Sede Central.

Ruta 8, km 18 Montevideo, Uruguay 13.000

Tribunal:

Presidente: Fernando Dutra

2° Integrante: Luis Samartino

3er Integrante: Javier Sánchez

C.I.	Nombre	Concepto	Nota
2.587.740-4	Alejandra Suanes Martínez	Muy Bueno	MB

Nota: La calificación mínima para aprobar la defensa es aceptable (A).

Nuevo sistema de calificación implementado a partir del 27/01/2025

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Fernando Dutra

Dr. Luis Samartino

Dr. Javier Sánchez



Ruta 8 Km.18



www.fvet.edu.uy



Teléfono: 1903

Agradecimientos

Al culminar esta etapa, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que me acompañaron y apoyaron a lo largo de este camino. En primer lugar, a mi tutor, el Dr. Andrés Gil, por su invaluable guía, paciencia y dedicación. Su conocimiento y compromiso han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo, y su ejemplo como investigador será siempre una inspiración para mi carrera. A mi familia, quienes han sido mi pilar incondicional en este recorrido. Gracias por su amor, apoyo y comprensión en los momentos más desafiantes. Especialmente a mis padres Mary y Gabriel y hermanas, a Lucho, Alfo y Martín. A mis compañeros de trabajo de la DILAVE, quienes no solo me brindaron apoyo profesional, sino también compañerismo y motivación en los momentos en los que más lo necesitaba. Gracias por compartir conmigo el entusiasmo por la investigación y por estar siempre dispuestos a colaborar y aprender juntos. Un agradecimiento especial a Xime y Vale. A la DILAVE, mi lugar de trabajo, por ofrecerme las herramientas y el entorno para crecer profesionalmente, y por el respaldo brindado durante el desarrollo de esta investigación. Finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación a través del Fondo Sectorial de Salud Animal (FSSA_X_2014_1_105711) del proyecto “Factores de dinámica poblacional y geo-ecológicos asociados a enfermedades reproductivas de los bovinos del Uruguay” donde se enmarca esta tesis. Su apoyo es clave para promover el desarrollo científico en nuestro país.

A todos, mi agradecimiento por haber sido parte de este proceso y por contribuir al logro de esta etapa cumplida.!!

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	7
SUMMARY	8
I REVISION BIBLIOGRÁFICA	9
Introducción	9
Agente	10
Taxonomía	11
Enfermedad y Epidemiología	12
Seroprevalencia y factores de riesgo	16
Diagnostico	18
Uruguay	20
Bibliografía	22
II HIPÓTESIS	28
III OBJETIVOS	28
IV ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	28
V CAPITULOS	30
CAPITULO 1. Estimar la sensibilidad, especificidad relativa y el acuerdo entre la prueba de MAT con aislamientos locales versus con cepas de referencia de <i>Leptospira spp.</i> patógenas.....	30
Introducción	30
Materiales y métodos	32
Resultados	35
Discusión	38
Bibliografía	40
Capítulo 2. Estimar la seroprevalencia de leptospirosis a nivel de vacas lecheras y de rebaños del Uruguay.....	43
Introducción	43
Materiales y Métodos	45
Resultados	49
Discusión	54
Conclusión	59
Bibliografía	59
Capítulo 3 Caracterizar el manejo reproductivo, sanitario en establecimientos lecheros del Uruguay	66
Introducción	66
Materiales y Métodos	67
Resultados	69
Discusión	76

Conclusión	81
Bibliografía	82
Capítulo 4 Identificar potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de leptospirosis a nivel de rebaño.....	86
Introducción	86
Materiales y Métodos	88
Resultados	91
Discusión	92
Conclusión	94
Bibliografía	95
VI CONCLUSIONES GENERALES	99
VII PUBLICACIONES	101

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira*. Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial. En los bovinos la enfermedad causa grandes pérdidas económicas debido a: abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y terneros que pueden morir durante la infección. La prueba de aglutinación microscópica (MAT), es el método de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis tanto para humanos como para animales. En nuestro país las serovares con mayor presencia desde el punto de vista serológico en la población bovina son: Hardjo y Pomona. En Uruguay se han aislado 3 especies del género *Leptospira*: *Leptospira borpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjobovis, *Leptospira interrogans* serovar Pomona tipo Kennewicki y *Leptospira noguchi*. El objetivo de esta tesis es profundizar en el diagnóstico serológico de abortos por leptospirosis bovino. Así mismo se pretende actualizar los datos de seroprevalencia y la asociación con potenciales factores de riesgo de leptospirosis bovina en ganado lechero del Uruguay. Se trabajó con focos de abortos asociados a *Leptospira* y establecimientos libres. Se evaluó las características (sensibilidad, especificidad y concordancia) de la prueba MAT con aislamientos autóctonos. A partir de un muestreo transversal se estimó la seroprevalencia de leptospirosis bovina en establecimientos lecheros de todo el país. A través de un cuestionario se identificaron posibles factores de riesgos asociados a la presencia de la enfermedad en el establecimiento. La detección con cepas locales fue más sensible que con cepas de referencia, ambas tuvieron un buen acuerdo. La seroprevalencia de *Leptospira* fue del 27,80% (IC 95% = 21,06 - 34,54) y 86,92% (IC 95% = 80,00 - 93,75%) a nivel animal y de rebaño, respectivamente. La serología confirma la predominancia de los serogrupos Sejroe y Pomona en nuestro rebaño, con la presencia de *Leptospira spp.* incidentales en menor proporción, y una amplia distribución a nivel de establecimientos. El tamaño de la población y el reemplazo de vacas en los predios lecheros se asociaron con los niveles de infección. Se confirmó que la leptospirosis es endémica en nuestros predios.

SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial disease caused by pathogenic microorganisms of the genus *Leptospira*. It is a zoonotic disease with worldwide distribution. In cattle, the disease causes significant economic losses due to abortions, infertility, reduced milk production, and calf mortality during infection. The microscopic agglutination test (MAT) is the reference method for the serological diagnosis of leptospirosis in both humans and animals. In our country, the serovars with the highest serological presence in the bovine population are Hardjo and Pomona. In Uruguay, three species of *Leptospira* have been isolated: *Leptospira borpetersenii* serovar Hardjo type Hardjobovis, *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki, and *Leptospira noguchi*. The objective of this thesis is to deepen the serological diagnosis of abortions due to bovine leptospirosis. Additionally, it aims to update data on seroprevalence and the association with potential risk factors for bovine leptospirosis in dairy cattle in Uruguay. The characteristics (sensitivity, specificity, and concordance) of the MAT test with local isolates were evaluated. Through a cross-sectional study, the seroprevalence of bovine leptospirosis was estimated in dairy farms nationwide. A questionnaire was used to identify potential risk factors associated with the presence of the disease in the farms. The sensitivity with local strains was higher than with reference strains, both showing good agreement. The seroprevalence of *Leptospira* was 27.80% (95% CI 21.06 - 34.54) at the animal level and 86.92% (95% CI 80.00 - 93.75%) at the herd level. Serology confirms the predominance of serogroup Sejroe and Pomona in our herds, with the presence of incidental leptospires in smaller proportions, and with wide distribution at the farm level. Population size and replacement of cows on dairy farms were associated with infection levels. It was confirmed that leptospirosis is endemic in our herds and is spreading across dairy farms.

I REVISION BIBLIOGRÁFICA

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira spp.*. Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, que afecta a la mayoría de los mamíferos domésticos y animales silvestres (Faine, S y col, 1999; Levett, 2001). Su incidencia es mayor en países tropicales y templados debido a las condiciones de humedad y temperatura que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, propiciando así la transmisión de la enfermedad (Bharti y col., 2003; Levett, 2001 Muñoz y col, 2020). El curso clínico de la enfermedad puede ser agudo, subagudo o crónico.

Esta zoonosis, se clasifica dentro de las enfermedades desatendidas y subnotificadas, junto con otras enfermedades como son el dengue y la leishmaniosis. Se estima que la enfermedad afecta a 1,03 millones de personas en todo el mundo y causa 58.900 muertes al año (Costa y col., 2015). Es una enfermedad vinculada al trabajo con animales, actividades recreativas (deportes acuáticos) así como también relacionadas a zonas urbanas asociadas a altas poblaciones de roedores infectados (Muñoz y col, 2020).

Su importancia en aspectos productivos radica en las pérdidas económicas que ocasiona debido a su impacto en animales de producción pecuario como: bovinos, ovinos, suinos y equinos. Estas pérdidas están vinculadas sobre todo a la eficiencia reproductiva y refugio de animales enfermos (Adler, 2015).

En seres humanos la enfermedad es conocida como síndrome de Weil, debido a que fue descrita por primera vez en 1886 por Weil. Sin embargo, se cree que ha afectado a trabajadores rurales en China, Japón y Europa durante milenios (Ko et al., 2009; Adler, 2015).

Agente

Los miembros del género *Leptospira spp* son bacterias pertenecientes al filo *Spirochaetes*, orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y se clasifican en tres grandes grupos: patógenas, intermedias y saprófitas, siendo las primeras el agente etiológico de la leptospirosis (Ko y col., 2009).

Los miembros de la familia *Leptospiraceae* son bacterias largas, delgadas, altamente móviles, con forma de espiral. Las especies patógenas tienen la capacidad de infectar, una amplia gama de huéspedes y sobrevivir en diversos ecosistemas (Adler, 2015).

El género *Leptospira* se caracteriza por su morfología con extremos en forma de gancho y dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) con inserciones polares en el espacio periplásmico, lo que les permite dos formas de movimiento: traslacional y no traslacional (Levett, 2001). Estas bacterias, con un diámetro promedio de 0.1 μm y una longitud de 6–20 μm , muestran velocidades de movimiento elevadas incluso en medios viscosos, facilitando su supervivencia en ambientes naturales y la invasión de tejidos en el huésped (Goldstein & Charon, 1988; Takabe et al., 2013). Morfológicamente, todas las *Leptospira spp.* son indistinguibles y su ultraestructura es similar a la de las bacterias Gram-negativas, aunque presentan menor actividad endotóxica (Faine et al., 1999; Adler, 2015).

El género *Leptospira* puede teñirse usando la contra tinción de carbol fucsina (Levett, 2001). Debido a su morfología y motilidad rápida, la microscopía de luz óptica normal es problemática para verlas y, en cambio, la bacteria se visualiza mejor usando la microscopía de campo oscuro (MCO). (Figura 1)

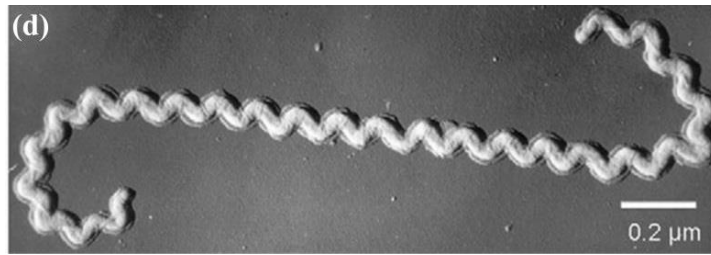


Figura 1. Morfología de *Leptospira*. Microscopía de campo oscuro (d) Fotomicrografía de *Leptospira* spp.. Se observan los extremos en forma de gancho, y la estructura espiralada del cuerpo celular, extraída de (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Son bacterias aerobias o microaerófilas, tanto oxidasa como catalasa positiva, por lo que son capaces de metabolizar el oxígeno. Presentan temperaturas óptimas de crecimiento de 28-30 °C, en un rango de pH de 7.2-7.6, y tiempos de duplicación in vitro largos de 6-18 horas (Adler, 2015).

Los requerimientos nutricionales esenciales para el crecimiento de *Leptospira* spp incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, vitaminas y suplementos específicos y ácidos grasos de cadena larga (Faine et al., 1999). El medio más comúnmente empleado para el cultivo de *Leptospira* spp. es el Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que incluye aditivos como seroalbúmina bovina, piruvato y suero de conejo (Adler, 2015).

Taxonomía

Existen dos sistemas de clasificación para el género *Leptospira*: fenotípico y genotípico, que a veces difieren. El sistema fenotípico divide las cepas en patógenas y saprófitas, siendo *Leptospira interrogans* sensu lato para patógenas y *Leptospira biflexa* sensu lato para saprófitas. La unidad taxonómica es el serovar, el cual queda definido en base a características antigénicas detectadas mediante la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) (Levett, 2001, 2015; Bharti y col., 2003). Los serovares, con características antigénicas similares, se organizan en serogrupos, los cuales no tienen valor taxonómico, pero son importantes para entender la dinámica epidemiológica de la

enfermedad. Por tanto, a nivel práctico, se sigue utilizando la clasificación fenotípica, debido a la relación entre serogrupos/serovares adaptados y no adaptados al huésped, lo que define los estados de portador crónicos de la enfermedad (Faine y col., 1999; Levett, 2001, 2015; Bharti y col., 2003; Ko y col., 2009).

Con el advenimiento de la biología molecular y el desarrollo de tecnologías basadas en el estudio del ADN (hibridación ADNADN, PCR de ADNr (genes que codifican ARNs ribosomales) y la secuenciación de genomas completos se logró obtener la clasificación genotípica del género *Leptospira*. Thibeaux y col (2018) publican 35 especies que comprenden más de 300 serovariedades (Picardeau, 2017; Vicent y col, 2019).

Fouts y col. (2016) mejoraron la comprensión de la filogenia del género *Leptospira* al dividirlo en tres grupos principales: "patógenos", "intermedios" y "saprófitos". Thibeaux y col. (2018) realizaron un estudio genómico de aislamientos ambientales, determinando una mayor heterogeneidad en la virulencia dentro del grupo "patógenos" y definen una independencia en la virulencia en los grupos "patógenos" e "intermedios". Sin embargo, Picardeau (2017) señaló que algunas especies "intermedias" están siendo cada vez más reconocidas en enfermedades humanas (Tsuboi et al., 2017; Puche et al., 2018). Vincent, y col. (2019) investigaron la relación genómica entre 90 aislamientos e identificaron 30 nuevas especies, propusieron reclasificar el género *Leptospira* en cuatro subgrupos: P1, P2, S1 y S2, en lugar de los anteriores: "saprófitos", "intermedios" y "patógenos". Todo este hallazgo supone un dinamismo en la clasificación genotípica del género *Leptospira*, la cual se encuentra en continua revisión.

Enfermedad y Epidemiología

La leptospirosis es un microorganismo ubicuo ampliamente extendido en muchas regiones con excepción de las regiones polares (Adler, 2015).

La enfermedad clínica causada por *Leptospira spp.* es comúnmente reportada en animales domésticos y humanos, presentando síndromes clínicos diversos como ictericia, hemorragia, uremia y problemas reproductivos (Faine, 1999; Radostits y col., 2002). Sin embargo, en la vida silvestre, se conoce poco sobre los efectos clínicos de la enfermedad.

Se ha demostrado o inducido la infección en animales como anfibios, reptiles y aves (Faine, 1994; Levett, 2001; Radostits y col., 2002). Aunque hasta la fecha no se ha evidenciado que estos animales actúen como reservorios de infección para humanos u otros animales, aunque sigue siendo posible que contribuyan a la epidemiología de la infección en ciertos ecosistemas.

Investigadores han identificado numerosas especies animales como hospedadoras del género *Leptospira*, considerando los aproximadamente 300 serotipos reconocidos hasta la actualidad (Levett, 2015; Cerqueira y Picardeau, 2009). Sin embargo, solo un pequeño conjunto de serovares es endémico en cada región o país específico (Adler, 2015). En un ecosistema dado, el papel de cada especie animal susceptible se divide en dos categorías principales: hospedadores de mantenimiento (adaptados) e incidentales (no adaptados) (Ellis, 2015; Levett, 2001).

El huésped de mantenimiento exhibe una afinidad innata hacia ciertos serovares, que tienden a persistir en el animal (Hathaway, 1981). Por ende, en una región dada, una especie animal se infectará predominantemente con serovares mantenidos por su propia especie o por aquellos mantenidos por otras especies animales presentes en la zona, resultando en infecciones incidentales (Adler, 2015).

La clave en la epidemiología de la leptospirosis es el portador renal que excreta los microorganismos en el medio ambiente, aunque también la transmisión sexual es importante en la infección intraespecie (Adler, 2015). La infección renal y la excreción urinaria pueden durar meses, y las bacterias pueden tener un tropismo importante para tejidos distintos al riñón, por ejemplo, el tracto genital (Ellis y col. 1986, Aymeé y col, 2024). La ruta venérea podría desempeñar un papel en la transmisión dentro de las especies de mantenimiento (Ellis 2015). Se demostró que los bovinos eliminan *Leptospira* spp. durante al menos 18 meses después de la infección experimental (Thiermann 1982). Aunque este periodo puede ser variable, Leonard y col (1992) observaron un menor periodo en la eliminación en orina, 10 meses, en hembras infectadas naturalmente, aunque la técnica que realizó para el estudio fue el cultivo bacteriológico, método de baja sensibilidad.

Hathaway (1981) y Ellis W y col (1984) definían las características de un huésped de mantenimiento e incidental, las cuales como se mencionó anteriormente, tienen implicancia en los ciclos epidemiológicos de la enfermedad:

Las características de un huésped de mantenimiento son:

1. Alta susceptibilidad del huésped a la infección.
2. Patogenicidad relativamente baja del organismo en el huésped.
3. Infección renal a largo plazo.
4. Transmisión natural dentro de la especie huésped.

Definieron además una población de mantenimiento como "una población de una especie de animal que actúa como un reservorio continuo de un serotipo en un ecosistema particular".

En contraste, los huéspedes incidentales se caracterizan por:

1. Baja susceptibilidad a la infección.
2. Un efecto patógeno a veces severo.
3. Una fase renal corta.
4. Transmisión intraespecie ineficaz.

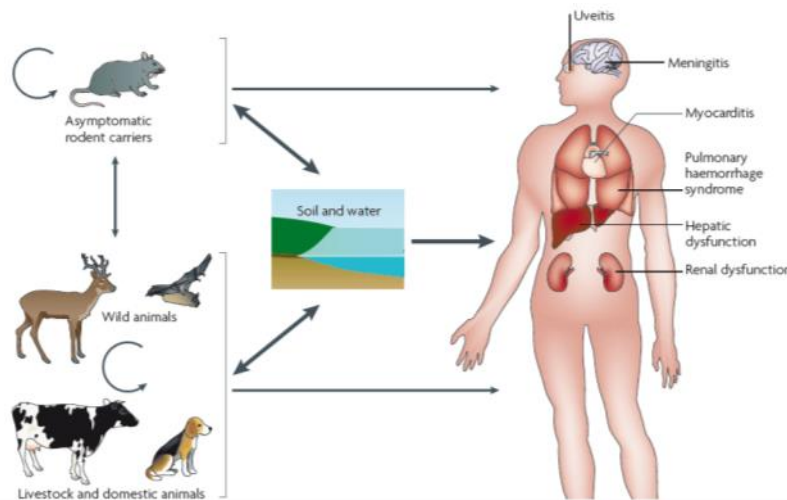


Figura 3. Esquema de ciclo epidemiológico de la leptospirosis. Extraído de Ko y col 2009.

Las principales infecciones mantenidas por el huésped de importancia mundial son la infección por *Icterohaemorrhagiae* en la rata marrón, *Rattus norvegicus*, Hardjo en bovinos y ovinos y Pomona y posiblemente Bratislava en cerdos y Canicola en perros. (Adler,2015).

Los seres humanos se consideran huéspedes incidentales y hay muy poca evidencia sobre el contagio intraespecie, por lo tanto, la transmisión de humano a humano se considera insignificante (Levett, 2001). La probabilidad de infección ha sido vinculada con ocupaciones como la caza, pesca, ganadería, agricultura, minería, y veterinaria, así como con las prácticas recreativas al aire libre. (Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

La infección se transmite al ser humano y entre animales domésticos y salvajes por contacto directo con la orina de animales infectados o indirectamente a través del contacto con ambientes contaminados (Gil y col, 2000) Figura 3.

La enfermedad si bien es endémica en varias regiones, se presenta frecuentemente como brotes epidémicos, ocasionando una severa enfermedad en animales y en el hombre que puede llegar a ser mortal.

En los bovinos la enfermedad causa grandes pérdidas económicas debido a: abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y terneros que pueden morir durante la infección (Adler y col, 2010). Los fetos abortados no presentan signos patognomónicos, aunque existe una profusa autólisis. Son susceptibles todas las edades o categorías. La enfermedad clínica se manifiesta con fiebre de 4 a 5 días, anorexia, conjuntivitis y alteración de la secreción láctea entre otros. Se observa una reducción brusca de producción láctea y es frecuente la mastitis. Los abortos ocurren entre la 1 y 3 semana post-infección, sobre todo en el último tercio de gestación. Existe retención placentaria hasta en un 20% de los animales abortados (Faine y col, 1999).

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

El bovino es huésped de mantenimiento de la serovar Hardjo. Existen 2 biotipos: Hardjobovis y Hardjoprajitno, las cuales pertenecen a especies diferentes *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* respectivamente (Adler B, 2015). *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo biotipo Hardjobovis es la cepa común de este serovar mantenida por el ganado, pero *Leptospira interrogans* serovar Hardjo biotipo Hardjoprajitno también ocurre en el ganado en algunas partes del mundo. Ambas cepas tienen la capacidad de colonizar y persistir en el tracto genital de vacas y toros infectados, lo que sugiere que la propagación venérea puede ser un factor de transmisión. (Adler B, 2015).

Seroprevalencia y factores de riesgo

Una revisión sistematizada en Europa demostró que los serogrupos de *Leptospira* más reportados en el ganado fueron Sejroe (58,5%), Australis (41,5%), Grippotyphosa (41,5%), Icterohaemorrhagiae (37,7%) y Pomona (26,4%), los cuales también se han

asociado con infecciones humanas a nivel mundial. El aborto (58,6%) y los trastornos de fertilidad (24,1%) fueron los signos de leptospirosis reportados más frecuentemente y generalmente se asociaron con infecciones crónicas (Sohm y col, 2023). Los factores de riesgo a nivel de rebaño se han estudiado principalmente en ganado lechero para la serovar Hardjo.

Los factores que más se detectan son: un mayor tamaño del rebaño, el pastoreo conjunto con ovejas infectados, el acceso a fuentes de agua contaminadas, el uso de un toro infectado, prácticas inadecuadas de cría y el reemplazo con la introducción de animales de otras granjas se han asociado con la seroprevalencia (Ellis, 1994, Lilenbaum y Santos, 1996; Miyama y col, 2018; Genovez y col 2020).

Existe en la bibliografía diferentes estudios científicos que han tratado de vincular diferentes factores asociados a la explotación ganadera con la presencia de la enfermedad. Lilenbaum y col (2003) realizaron un estudio de factores de riesgo en Brasil y encontraron que los rebaños con control veterinario permanente o visitados por lo menos cada 2 semanas registraron tasas de seroreactividad de 54,1 y 56,1%, respectivamente. Por otro lado, los rebaños visitados con menor frecuencia y los que no tienen ninguna asistencia veterinaria mostraron tasas seroreactividad mucho mayor de 91,3% y 97,4%, respectivamente. Otro factor de riesgo fue el co-pastoreo con otras especies, principalmente los cerdos, encontrando que las infecciones fueron en su mayoría por los serovares: Pomona y Bratislava. Otro estudio en Irlanda, España y USA coinciden en que los factores de riesgo para la Leptospirosis a nivel de establecimiento asociados a la serovar Hardjo en rebaños lecheros incluyen: mayor tamaño poblacional, co-pastoreo con ganado infectado u ovejas, el acceso del ganado a la contaminación de cursos de agua, uso de toro para la reproducción; cría inadecuada de terneros y la adquisición de animales de reemplazo (Alonso-Andicoberry y col 2001, Lilenbaum y col, 2009; Oliveira y col. 2010). En Japón Miyama, y col (2018) encontraron como factor de riesgo que los propietarios de grandes rebaños que introducen vacas de una zona del país a otra aumentaban el riesgo de infección.

Diagnostico

Las alternativas del diagnóstico de laboratorio para la leptospirosis son: examen directo de muestras sospechosas en microscopio de campo oscuro; cultivo bacteriano a partir de muestras clínicas; detección de anticuerpos a partir de pruebas serológicas; y detectar la presencia de ADN por técnicas de biología molecular (Faine y col., 1999, Bharti y col., 2003, Adler, 2015). Las pruebas disponibles tienen diferentes características diagnósticas, dependiendo del tipo de tejido disponible, el curso de la enfermedad y el propósito de la prueba (Jouglaard y col., 2006). Un gran número de técnicas serológicas son usadas para el diagnóstico de la leptospirosis, cada una con su sensibilidad y especificidad diferentes. El inmunoensayo enzimático (ELISA) y la prueba MAT son los métodos de laboratorio más comúnmente utilizados.

La MAT, desarrollada por Martin & Petit (1918), sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis tanto para humanos como para animales (Subharat y col., 2011; Picardeau, 2013). La MAT cuantifica anticuerpos contra Leptospirosis en el suero sanguíneo, donde la unidad de estudio es el serogrupo. Tiene la desventaja de trabajar con microorganismos vivos, esto hace que los laboratorios tengan que contar con un buen nivel de bioseguridad, además de ser una técnica laboriosa ya que hay que mantener un cepario de *Leptospira* vivas. El MAT detecta anticuerpos aglutinantes IgM e IgG. No diferencia anticuerpos vacunales de los de infección, si los animales están recientemente vacunados.

Ensayos experimentales que estudiaron la respuesta serológica en el ganado después de la vacunación registraron títulos de MAT desde indetectables hasta un máximo de 3.000 aproximadamente (Marshall y col., 1979; Wilson-Welder y col., 2021). Los anticuerpos inducidos por la vacuna en el ganado disminuyen dentro de los 3 meses post-vacunación, aunque en algunos casos pueden persistir seis meses después de la vacunación (Marshall y col., 1979; Martins y col., 2018). Estos datos hay que tenerlos en cuenta a la hora de hacer la interpretación de los resultados del laboratorio. Otra característica del MAT es la pobre correlación entre estado serológico de un animal y su estado portador (Ellis y col., 1981). Es así que se han recuperado *Leptospira spp.* de portadores seronegativos por cultivo de orina o riñón (Ellis y col., 1981, Thiermann 1984).

Para obtener una sensibilidad adecuada deben usarse serogrupos representativos en la región o país. Ellis y col (1984) encontraron que en la infección por Hardjo en bovinos con un nivel de anticuerpos de 1:10 la sensibilidad del ensayo (MAT) fue de 67% y la especificidad es de 86%. Cuando el punto de corte aumentaba a 1/100, la sensibilidad disminuía a 41,0 %, pero la especificidad mejoraba a 100%.

En abortos causados por infecciones en huéspedes incidentales el título de anticuerpos aglutinantes de los animales es $> 800-1600$. Sin embargo, en los huéspedes de mantenimiento, particularmente la infección por Hardjo, los animales infectados tienen a menudo una respuesta de anticuerpos pobre a la infección. A menudo en el momento del aborto, los títulos de anticuerpos pueden ser bastante bajos o negativos contra el serovar Hardjo. En estos casos, la respuesta serológica del rebaño a la infección o detección del organismo en tejidos o fluidos es a menudo más útil que el título de anticuerpo en un animal individual. (Bolin C, 2003).

Hathaway y col (1986) estudiaron la variación de prevalencias por estaciones del año y encontraron que las diferencias son pronunciadas, así como la transmisión de la enfermedad está influenciada por la época del año, manejo y composición de las categorías del rebaño. Además, la diferencia entre la seroprevalencias y prevalencia acumulativa de infección fue importante. Esto se debió principalmente a los niveles de descenso rápido de las aglutininas en los sueros a medida que aumentaba el tiempo después de la infección y se observó que el mayor efecto fue en las vacas en su segunda lactación o subsecuente, la mayoría de los cuales habían experimentado infección a Hardjo más temprano en la vida.

El MAT tiene limitaciones en el diagnóstico de infección crónica a nivel animal, tanto en el diagnóstico de aborto como en la identificación de animales donde los títulos están disminuidos o permanecen estáticos. Los animales infectados pueden tener títulos en la MAT por debajo del título de corte usado. (Ellis y col, 1982, 1986; Otaka y col. 2012; Hamond y col. 2014). El MAT se utiliza principalmente como prueba de rebaño. Para información útil, al menos 10 animales o el 10% del rebaño, lo que sea mayor, debe ser muestreado o el muestreo de una serie de cohortes (edades) (Hathaway y col, 1986). Sin embargo, el diagnóstico tanto en leptospirosis aguda como en aborto puede inferirse

cuando la mayoría de los animales afectados tienen títulos de 1.000 o más (Ellis y col., 1982); Sin embargo, lo contrario no es cierto.

Uruguay

Los primeros estudios en el Uruguay fueron del Dr. Raimundo Leaniz y col en 1959 y fueron realizados a través de análisis serológicos de la enfermedad. Recién en 1965, el Dr. Roberto Caffarena realiza los primeros estudios de seroprevalencia en ganado bovino, siendo la misma de 20%. En 1966, el Dr. Cachione y col encuentran una seroprevalencia de 24%. Posteriormente el Dr. Gil y col (1998) realizan un nuevo estudio de prevalencia en ganado bovino lechero siendo la misma de 14%. Repiso y col (2005) realizan un estudio vinculado a enfermedades de la reproducción el ganado de carne, estimándose una seroprevalencia en ganado de carne de 38,5%. En el año 2003, Gil y col realizan un monitoreo en salud animales en la cuenca lechera sur del Uruguay (San José, Colonia y Florida) encontrando que las seroprevalencias variaban según el área geográfica de 11-50%.

La División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) cuenta con un servicio de leptospirosis, en el Departamento de Bacteriología. La técnica MAT, es la prueba de referencia recomendada tanto por la Organización Internacional de Salud Animal (OMSA) como por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En nuestro país las serovares con mayor presencia desde el punto de vista serológico en la población bovina son: Hardjo y Pomona. Existen variaciones entre los años, lo cual puede explicarse por la influencia climática y estacional de la enfermedad (Suanes A, 2013). En el año 2014 se comenzó con el aislamiento de *Leptospira* de casos de aborto bovino, al 2024 se cuenta con 3 especies aisladas: *Leptospira borpetersenii* serovar Hardjo, *Leptospira interrogans* serovar Pomona tipo Kennewicki y *Leptospira noguchi*.

En Uruguay la leptospirosis humana es una enfermedad de notificación obligatoria que debe realizarse frente a la sospecha de la enfermedad, aún no confirmada por laboratorio. Las notificaciones se realizan al Departamento de Vigilancia Epidemiológica del M.S.P. Según reporte de la Unidad de Epidemiología del año 2022, se notificaron 57

casos de Leptospirosis con una incidencia acumulada de 1.6/100 mil habitantes. No hubo ninguna muerte reportada.

Desde el año 2014, a partir de 2 proyectos financiados por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Innovagro y Alianza, se viene trabajando con un grupo multidisciplinario de instituciones: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Instituto Pasteur de Montevideo (IPM), Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) y Facultad de Medicina, Instituto de Higiene (IH) en el aislamiento de cepas autóctonas de *Leptospira* en bovinos. Hasta la fecha se cuenta con un cepario nacional en DILAVE de 20 aislamientos en su mayoría provenientes de focos de abortos de ganado de carne y de leche. Los microorganismos del género *Leptospira* aisladas hasta el momento corresponden a 3 especies: *Leptospira Borpetersenii* serovar Hardjo, *Leptospira interrogans* serovar Pomona tipo Kennewicki y *Leptospira noguchi*. Este hallazgo abre interesantes oportunidades tanto en el área de la epidemiología como del diagnóstico de esta enfermedad.

En la DILAVE históricamente se ha realizado el diagnóstico de *Leptospira* a partir de la técnica de referencia MAT. Cuenta con un cepario propio de *Leptospira spp.* de referencia (24 serovares) provenientes del Instituto Osvaldo Cruz, de Rio de Janeiro. Si bien la técnica de MAT como se realiza actualmente detectó todos los focos donde se realizaron aislamiento, la misma se ha comportado como una prueba de rebaño no pudiendo en todos los casos predecir la infección a nivel individual. Si bien a partir de trabajos publicados se conoce que no siempre hay una correlación entre la serología y la infección del animal, sería oportuno estudiar este componente del diagnóstico en nuestro país. El veterinario de campo, así como el productor buscan una respuesta al diagnóstico de un animal en concreto. ¿El animal aborto por Leptospirosis? Este tipo de pregunta es difícil de responder en rebaños con evidencia clínica de aborto, con una serología de MAT a títulos bajos. Esta tesis pretende contribuir a dar algunas respuestas estudiando más en profundidad aspectos referentes al diagnóstico serológico de aborto bovino, ya que el MAT continua en la actualidad siendo la técnica de referencia. Los resultados tendrán una aplicación directa en el diagnóstico de la enfermedad en nuestro país. Otro objetivo de la misma será actualizar los datos de seroprevalencia y estudiar posibles factores asociados a la enfermedad para poder realizar intervenciones en el control de la Leptospirosis.

Bibliografía

1. Adler, B. (Ed.). (2015). Current Topics in Microbiology and Immunology. Australian Research Council Centre of Excellence in Structural and Functional Microbial Genomics, Monash University, Clayton, VIC, Australia: Springer.
2. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287–296.
3. Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. J., Pereira-Bueno, J., Costas, E., & Ortega-Mora, L. M. (2001). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 109-117.
4. Atxaerandio, R., Aduriz, G., Ziluaga, I., Esteban, J. I., Maranda, L., & Mainar-Jaime, R. C. (2005). Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *The Veterinary Record*.
5. Aymée, L., Mendes, J., & Lilenbaum, W. (2024). Bovine genital leptospirosis: An update of this important reproductive disease. *Animals*, 14(2), 322.
6. Bharti, A. R., Nally, J. E., & Ricaldi, J. N. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 757-771.
7. Bolin, C. (2003). Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference, March 12-14, 2003, Reno, NV—158.
8. Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 760–768.
9. Cole, J. R., Sulzer, C. R., & Pursell, A. R. (1973). Improved microtechniques for the leptospiral agglutination test. *Applied Microbiology*, 25, 976-980.
10. Elder, J. K., McKeon, G. M., Duncalfe, F., Ward, W. H., & Leutton, R. D. (1986). Epidemiological studies on ecology of *Leptospira interrogans* serovars Pomona and Hardjo in Queensland. *Preventive Veterinary Medicine*, 3, 501–521.
11. Ellis, W. A. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(3), 463–478.
12. Ellis, W. A., & Little, T. W. A. (Eds.). (1984). The present state of leptospirosis diagnosis and control. Academic Press.

13. Ellis, W. A., & Michna, S. W. (1976). Bovine leptospirosis: Infection by the Hebdomadis serogroup and abortion. A herd study. The Veterinary Record, 99, 409-412.
14. Ellis, W. A., O'Brien, J. J., & Cassells, J. (1981). Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype Hardjo infection in Northern Ireland. The Veterinary Record, 108, 555-557.
15. Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Bryson, D. G., & Mackie, D. P. (1985). Bovine leptospirosis: Some clinical features of serovar Hardjo infection. The Veterinary Record, 117, 101-104.
16. Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Neill, S. D., & Hanna, J. (1982). Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. The Veterinary Record, 110, 178-180.
17. Ellis, W. A., Songer, J. G., Montgomery, J., & Cassells, J. A. (1986). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. The Veterinary Record, 118, 11-13.
18. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci.
19. Genovez, M. E., Escocio, C., Castro, V., Gabriel, F. H. L., Chiebao, D. P., & Azevedo, S. S. (2020). Risk factors associated with *Leptospira spp.* serovar Hardjo infection in sheep-only herds and in sheep-cattle herds. Arquivos do Instituto Biológico, 78, 587-592.
20. Gil, A. D., & Samartino, L. E. (2000). Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. FAO: PE1/211 - AGAH-407.
21. Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 65-97). Current Topics in Microbiology and Immunology (Vol. 387). Berlin, Heidelberg: Springer.
22. Hamond, C., Martins, G., & Lilenbaum, W. (2012). Rapid and efficient diagnosis of leptospirosis in an aborted foal by PCR of gastric juice. Veterinary Microbiology, 160, 274-275.
23. Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A. P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. Veterinary Research Communications, 38, 81-85.

24. Hathaway, S. C., & Little, T. W. A. (1983). Epidemiological study of *Leptospira* Hardjo infection in second-calf dairy cows. *The Veterinary Record*, 112(10), 215-218.
25. Hathaway, S. C., Little, T. W., & Pritchard, D. G. (1986). Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in bovine populations. *The Veterinary Record*, 119, 84-86.
26. Hodges, R. T. (1974). Some observations on experimental *Leptospira* serotype Pomona infection in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 22, 151-154.
27. Jouglaard, S. D., Simionatto, S., Seixas, F. K., Nassi, F. L., & Dellagostin, O. A. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 747-752.
28. Kingscote, B. (1988). Leptospiral antibodies in cattle in Alberta and evidence of an emerging serovar. *Canadian Veterinary Journal*, 29, 647-653.
29. Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 736-747.
30. Leonard, F. C., Quinn, P. J., Ellis, W. A., & O'Farrell, K. (1992). Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *The Veterinary Record*, 131(19), 435-439.
31. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology*, 14(2), 296-326.
32. Levett, P. N. (2015). Systematics of Leptospiraceae. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 11-20). *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387). Berlin, Heidelberg: Springer.
33. Lilenbaum, W., & Santos, M. R. (1996). Effect of management systems on the prevalence of bovine leptospirosis. *The Veterinary Record*, 138(23), 570-571.
34. Lilenbaum, W., & Souza, G. N. (2003). Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*, 75(3), 249-251.
35. Lilenbaum, W., Vargas, R., Ristow, P., Cortez, A., Souza, S. O., Richtzenhain, L. J., & Vasconcellos, S. A. (2009). Identification of *Leptospira spp.* carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*, 87, 16-19.

36. Manual Terrestre de la OMSA (2021). Leptospirosis. Capítulo 3.1.1.2. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Leptospirosis.pdf Fecha de consulta: 22/05/2021.
37. Marshall, R. B., Broughton, E. S., & Hellstrom, J. S. (1979). Protection of cattle against natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo using a Hardjo-Pomona vaccine. *New Zealand Veterinary Journal*, 27, 114-116.
38. Martin, L., & Pettit, A. (1918). Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hopitaux de Paris*, 42, 972-675.
39. Martins, G., Oliveira, C. S., & Lilenbaum, W. (2018). Dynamics of humoral response in naturally infected cattle after vaccination against leptospirosis. *Acta Tropical*, 187, 87–91.
40. Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., Urushiyama, Y., Kawahara, N., & Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 149, 15–20.
41. Muñoz-Zanzi, C., Groene, E., Morawski, B. M., Bonner, K., Costa, F., & Bertherat, E. (2020). A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Revista Panamericana de Salud Pública*.
42. Oliveira, F. C. S., Azevedo, S. S., Pinheiro, S. R., Batista, C. S. A., Moraes, Z. M., Souza, G. O., Gonçalves, A. P., & Vasconcellos, S. A. (2010). Risk factors associated with leptospirosis in cows in the state of Bahia, northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 398–402.
43. Otaka, D. Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: Herd and individual approaches. *The Veterinary Record*, 170, 338.
44. Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43, 1-9.
45. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). Leptospirosis. En O. M. Radostits, C. C. Gay, D. C. Blood & K. W. Hinchcliff, *Medicina Veterinaria: Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino* (9a ed., pp. 1150-1168). Madrid: McGraw-Hill.
46. Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., & 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.
47. Sanhueza, J. M., Heuer, C., & West, D. (2013). Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, 112, 90–98.
 48. Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2023). A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. *One Health*, 17.
 49. Subharat, S., Wilson, P. R., Heuer, C., & Collins-Emerson, J. M. (2011). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 743-752.
 50. Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., & Kudo, S. (2013). Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology and Immunology*, 57(3), 236–239.
 51. Thiermann, A. B. (1982). Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *American Journal of Veterinary Research*, 43(5), 780-784.
 52. Thiermann, A. B. (1984). Isolation of leptospirae in diagnosis of leptospirosis. *Modern Veterinary Practice*, 65, 758-759.
 53. Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5).
 54. Vinetz, J. M. (2001). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14(5), 527-538.
 55. Wilson, P. R., Collins-Emerson, J. M., & Heuer, C. (2013). Leptospirosis in farmed deer. In A. Lawrence & P. R. Wilson (Eds.), *Farmed Deer: A Veterinary Handbook* (pp. 130–143). Hamilton, New Zealand: NZ Veterinary Association.
 56. Wilson-Welder, J. H., Alt, D. P., Nally, J. E., & Olsen, S. C. (2021). Bovine immune response to vaccination and infection with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *mSphere*, 6(2).

57. World Health Organization (WHO). (2003). Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO.
58. Zaki, S. R., & Shieh, W. J. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage, Nicaragua, 1995. *The Lancet*, 347(9000), 535–536.
59. Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Ríos, C., Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium. (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).
60. Zhang, C., & Wang, H. (2019). Recent advances in the molecular diagnosis of leptospirosis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(4), 563–571.
61. Zuerner, R. L. (2015). Genomic insights into the biology of leptospires. In B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis* (pp. 73-92). *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387). Berlin, Heidelberg: Springer.
62. Zuerner, R. L., Alt, D. P., & Bolin, C. A. (2005). *Leptospira* infection of cattle: Current research and future directions. *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 48, 67-70.
63. Zurita, S., Arriaga, J. E., & Pulido, M. (2013). Leptospirosis en bovinos: características generales y situación en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(4), 461–472.

II HIPÓTESIS

Las hipótesis que dan origen a esta propuesta son las siguientes:

1. Utilizar cepas de *Leptospira spp.* provenientes de aislamientos locales mejorará la sensibilidad de la técnica de MAT.
2. Conocer las sero-prevalencias prediales y animales y los factores asociados a estas permitirá diseñar mejores estrategias de intervención a nivel predial

III OBJETIVOS

Objetivo General

Mejorar los protocolos de diagnóstico serológico de MAT, actualizar la información de seroprevalencia e identificar asociaciones con potenciales factores de riesgo de leptospirosis bovina en ganado lechero del Uruguay.

Objetivos Específicos

1. Estimar la sensibilidad, especificidad relativa y el acuerdo de la técnica de MAT con aislamientos locales versus de referencia.
2. Estimar la seroprevalencia de leptospirosis en las vacas lecheras y rebaños del Uruguay.
3. Caracterizar el manejo reproductivo, sanitario en establecimientos lecheros del Uruguay.
4. Identificar potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de leptospirosis a nivel de rebaño.

IV ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se trabajarán con establecimientos focos de abortos por *Leptospira spp.* y establecimientos libres y en ellos se muestrearán animales con y sin antecedentes de aborto. A las vacas seleccionadas se les tomarán muestras para serología, bacteriología y biología molecular. Una vez definido el estatus de infección de cada animal se evaluarán las características (sensibilidad, especificidad) de una prueba MAT con aislamientos

autóctonos. Además, se estudiará la concordancia de la prueba de MAT con cepas de referencia y prueba de MAT con aislamientos nacionales.

A partir de un muestreo transversal se estimará la seroprevalencia de leptospirosis bovina en establecimientos lecheros de todo el país. El muestreo se realizará en 2 etapas. Para la primera etapa se estima que se deberían muestrear más de 105 establecimientos para estimar una proporción de 25% de las variables de interés con un error de hasta 5% a un nivel de confianza del 95%. Para la segunda etapa, dentro de cada establecimiento se muestrearán en forma aleatoria hasta 60 vacas mayores de 2 años para poder detectar serologías reaccionantes con un 95% de confianza, si las sero-prevalencias son iguales o superiores al 5%. Se tomarán muestras de sangre y se realizará un cuestionario en cada establecimiento. Se identificarán factores asociados a la presencia de la enfermedad en el establecimiento y la asociación de la seroprevalencia con las tasas reproductivas.

V CAPITULOS

Capítulo 1. Estimar la sensibilidad, especificidad y el acuerdo entre la prueba de MAT con aislamientos locales versus con cepas de referencia de *Leptospira spp.* patógenas.

Introducción

La leptospirosis es una infección zoonótica causada por miembros patógenos del género *Leptospira spp.*. Muchos mamíferos, incluidos los animales domésticos, silvestres y los seres humanos, pueden verse afectados por la leptospirosis (Adler y de la Pena Moctezuma, 2010). En el ganado, el microorganismo ocasiona problemas reproductivos como infertilidad y aborto. El serogrupo Sejroe, particularmente la serovar Hardjo es crónica en los bovinos y estos actúan como portadores subclínicos de la enfermedad. Sin embargo, otras serovares pueden infectar al ganado ocasionando una enfermedad con sintomatología aguda (Adler, 2015).

El diagnóstico de la Leptospirosis tanto en humanos como en animales puede realizarse a partir de pruebas diagnósticas directas e indirectas. Los métodos directos son mayoritariamente el cultivo bacteriológico y la prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). El aislamiento de *Leptospira spp.* suele ser dificultoso, teniendo una pobre sensibilidad (Adler, 2015). Sin embargo, es importante hacer una vigilancia basado en cultivo, tanto en humanos como en animales y de esta forma conocer que está circulando en un país o región. La obtención de un cultivo puro de *Leptospira spp.* y la caracterización del mismo a partir de la prueba de Cross-Agglutinin Absorption Test (CAAT) permite poder llegar a la identificación a nivel de serovar. Otro método directo en el cual se ha profundizado cada vez más en los últimos años son las pruebas de biología molecular. Esta herramienta se destaca por su rapidez, sensibilidad y facilidad de estandarización (Adler, 2015). En el campo de la medicina veterinaria, la prueba de PCR representa un buen recurso para detectar animales portadores. Esto se debe a que, en casos de infección crónica, los niveles de anticuerpos pueden ser a veces indetectables mediante pruebas serológicas (OMSA, 2021). A pesar del creciente uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de Leptospirosis, estas aún no han reemplazado por completo a la prueba serológica MAT.

Para diagnosticar la enfermedad a nivel indirecto, se emplea la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* en la sangre a través de pruebas serológicas. Entre estas pruebas se incluyen las más comúnmente usadas la MAT, así como el ELISA, para detectar tanto IgM e IgG (Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013; OMSA, 2021). Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, 2021) recomiendan la MAT para el diagnóstico de la enfermedad.

La prueba MAT se considera la prueba de referencia para el serodiagnóstico de leptospirosis en animales y humanos. Si bien presenta una excelente especificidad y sensibilidad en infecciones agudas, tiene algunas limitaciones, como su baja sensibilidad en fases tempranas de la enfermedad aguda y en portadores crónicos, la incapacidad para distinguir entre anticuerpos de vacunación e infección, y la dificultad para determinar el serovar infectante debido a reacciones cruzadas (Musso y La Scola, 2013; OMSA, 2021; Balboni y col, 2023).

En humanos, estudios de la prueba de MAT determinan que los valores de sensibilidad pueden variar entre 49,8% a 100% según se realice en sueros de pacientes convalecientes o en la fase aguda de la enfermedad. La especificidad se reporta con valores entre 90 % y 100%. (McBride et al. 2007; Hernández-Rodríguez et al, 2011; Limmathurotsakul et al. 2012)

En animales la prueba de MAT presenta mayor sensibilidad cuando se utiliza en el diagnóstico de infecciones agudas en muestras pareadas comparada con las infecciones crónicas (Ellis, 1986; Bolin, 2003). Ellis (1986) demostró que en infecciones crónicas debido a serovares adaptados al huésped (Hardjo) la sensibilidad de la prueba era de 67% cuando se utilizan títulos de corte de 1/10, pero cuando el título de corte aumentó a 1/100, la sensibilidad de la prueba se redujo a 41% y especificidad de 100%. Como ya se mencionó, la especificidad de la prueba MAT es alta; generalmente, los anticuerpos contra otras bacterias no generan reacciones cruzadas significativas con *Leptospira spp.* (OMSA; 2021). No obstante, hay reacciones serológicas cruzadas importantes entre serovares dentro del género, sobre todo las pertenecientes al mismo serogrupo, lo que implica que un animal infectado con un serovar puede tener anticuerpos que reaccionen de manera cruzada con otros serotipos (habitualmente a títulos más bajos) en la MAT.

Por lo tanto, la serología no puede usarse para identificar de manera definitiva el serovar infectante en una infección individual o en un brote, siendo necesario el aislamiento del agente para una identificación precisa (Bolin y col, 2003; OMSA, 2021).

La MAT implica el uso de un panel de *Leptospira spp.* vivas representativas de los serovares circulantes en la región o país. Si bien no se puede estandarizar completamente, se puede lograr una mejor performance de los resultados participando en el esquema internacional de pruebas de aptitud de MAT de International Leptospira Society (ILS) (Goris et al., 2014).

En animales con infección crónica, los niveles de anticuerpos son bajos, por este motivo es que se necesitan buscar métodos más sensibles o mejorar los ya existentes para detectar los anticuerpos en sangre o el organismo en la orina o tracto genital (Mughini-Gras et al., 2014, OMSA, 2018, Aymée y col, 2024).

El uso MAT en ganado bovino está indicado como prueba de rodeo, a nivel individual es limitado sobre todo debido a su baja sensibilidad en serovares adaptadas al huésped (crónicas), como ser la infección con Hardjo (Libonati y col, 2017). También se ha demostrado que el ganado puede no reaccionar contra sus propios aislamientos en la prueba de MAT (Libonati y col, 2017).

Debido a que la prueba serología MAT continúa siendo la prueba de referencia y más allá de sus desventajas es la técnica elegida para el diagnóstico de la Leptospirosis, es necesario evaluar su comportamiento frente a aislamientos locales. De esta forma se estudió si esta inclusión mejora la detección de animales seropositivos en bovinos. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es estimar la sensibilidad y especificidad de la técnica de MAT y estimar el acuerdo entre el diagnóstico de MAT con cepas de referencia versus MAT con cepas locales.

Materiales y métodos

Se contó con un banco de sueros de animales infectados provenientes de 8 rebaños lecheros con antecedentes de aborto por *Leptospira spp.* y sin antecedentes de vacunación contra la enfermedad en los últimos 12 meses. Se eligieron sueros de animales sin antecedentes de vacunación ya que en animales vacunados los resultados de MAT

generarían un sesgo teniendo en cuenta que esta prueba no diferencia anticuerpos vaccinales de los de infección (Smythe y col, 2009). Los animales sin antecedentes de vacunación disponibles provenían de 18 sueros de animales para ser incluidos en el estudio con las características antes mencionadas.

Los rebaños muestreados fueron previamente detectados como focos por ser seropositivos a MAT (con cepas de referencia) en el laboratorio de la DILAVE y antecedentes de abortos. Este banco de sueros fue construido a partir de un proyecto de investigación ANII-Alianza denominado “Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospira spp.* aisladas de casos de leptospirosis bovina en Uruguay”. En dicho proyecto participó, el IPM, Instituto de Higiene, INIA y DILAVE.

Para evaluar la sensibilidad se utilizó los animales provenientes de focos. Los animales “infectados” se definieron en base a su estatus de infección con aislamiento de *Leptospira spp.* patógenas y antecedente clínicos (aborto).

Para estudiar la especificidad se usaron 40 muestras de suero de animales sanos. Los sueros fueron obtenidos del predio La Estanzuela, INIA, donde se extrajo sangre a terneros separados de sus madres inmediatamente posteriores al parto y previo a la ingesta de calostro. Además, el predio no presentaba antecedentes de la enfermedad ni aislamientos de *Leptospira spp.* a nivel de rodeo. Los animales estaban clínicamente sanos en el momento de la extracción de las muestras de sangre. Estos animales se definieron como “no infectados”

Para la interpretación de los resultados se utilizó un punto de corte de MAT mínimo de 1:100 y un título máximo de 1:6400. Para realizar la prueba de MAT el cepario se mantuvo en medio de cultivo líquido EMJH enriquecido con albumina bovina. Los tubos con medio inoculados con las diferentes serovares se mantuvieron en estufa a 29°C durante 7 días hasta que la turbidez del medio alcance 1×10^8 leptospirosis /ml. Todas las serogrupos/serovares de *Leptospira spp.* fueron chequeadas con sueros hiperinmunes de referencia previo a su utilización. Se consideró a una muestra positiva cuando luego de la incubación y observación al microscopio de campo oscuro (MCO) haya mostrado al menos un 50% de aglutinación, dejando el 50% de *Leptospira spp.* libres, al compararlo

con un control que consiste en un cultivo de *Leptospira spp.* diluido 1:2 en suero fisiológico (OMSA, 2021).

Los sueros se procesaron por MAT con 6 serogrupos conteniendo 7 serovares de referencia: (Pomona, Harjobovis, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola y Pyrogenes) (Tabla 1). Así mismo, se incluyeron los 3 serogrupos y serovares locales aisladas hasta el momento: *Leptospira Borpetersenii* serogrupo Hardjo, *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona y *Leptospira noguchii* serogrupo Pyrogenes (Tablas2). Se consideraron reaccionantes aquellos sueros con títulos ≥ 100 para los diferentes serovares.

Tabla 1. Cepas de *Leptospira spp.* de referencia utilizadas como antígeno para la determinación de títulos de anticuerpos mediante prueba de MAT en sueros bovinos

Género/especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjo-Bovis
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjo-Prajitno
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ictero I
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem

Tabla 2. Cepas de *Leptospira* locales utilizadas como antígeno para la determinación de títulos de anticuerpos mediante prueba de MAT en sueros bovinos

Género/especie	Serogrupo	Serovar
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Kennewicki
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo
<i>L. noguchii</i>	Pyrogenes	ND ^a

^a ND: no determinada

Se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad con el software Winepi 2.0 (<http://www.winepi.net/>) y los valores de concordancia por el índice Kappa de Cohen. Se tomó la clasificación Altman (1991) para indicar el estatus del índice de Kappa y evaluar el acuerdo entre los resultados de MAT cepas locales y de referencia. Los coeficientes registran valores que van desde 0 a 1, siendo 0 el valor donde hay mayor desacuerdo entre pruebas y 1 el punto donde encontramos mayor acuerdo. Su

clasificación indica que los valores de Kappa pueden ser Pobres (0 a 0.20), Débiles (0.21 a 0.40), Moderados (0.41 a 0.60), Buenos (0.61 a 0.80) y Muy buenos (0.81 a 1.00).

Resultados

Se procesaron 58 muestras de suero de bovinos, 18 animales con aislamiento de *Leptospira spp.* patógenas y 40 muestras de animales provenientes de un predio libre de la enfermedad. En la Tabla 3 se puede observar la seroreactividad de los 18 animales con aislamiento de *Leptospira spp.* patógenas. Se identifican los títulos máximos para cada serovar reactiva tanto de referencia como locales.

Tabla 3. Seroreactividad de MAT frente a antígenos de *Leptospira* locales y de referencia en bovinos provenientes de predios sin antecedentes de vacunación y con cultivo positivo de *Leptospira spp* patógenos.

Identificación de cepas	Genero_especie (serogrupo)	Seroreactividad frente a cepas de referencia (serogrupos/título)	Seroreactividad frente a cepas locales (serogrupo/título)
IP1507003	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 200	Pomona / 6400
IP1509008	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Nr ^a	Pomona / 200
IP1509009	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 1600
IP1509010	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 6400
IP1512011	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Nr	Pomona / 100
IP1512014	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 400	Pomona / 3200
IP1710039	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400	Pomona / 6400
IP1710040	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400 Sejroe Hardjobovis / 3200 Sejroe Hardjoprajitno / 1600	Pomona / 6400 Hardjobovis /800
IP1710043	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 3200 Sejroe Hardjobovis / 800	Pomona / 1600
IP1710044	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 3200 Serjoe Hardjobovis / 3200 Serjoe Hardjoprajitno / 800	Pomona / 3200 Hardjobovis/800

IP1710045	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Pomona / 6400	Pomona / 6400
IP1710047	<i>L. interrogans</i> (Pomona Kennewicki)	Nr	Pomona / 100
IP1506001	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Pomona / 400	Sejroe / 200
IP1509005	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Nr	Sejroe / 400
IP1509006	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Nr	Sejroe / 800
IP1512013	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Nr	Sejroe / 400
IP1708034	<i>L. borgpetersenii</i> (Sejroe Hardjo)	Nr	Sejroe / 400
IP1605021	<i>L. noguchii</i> (Pyrogenes)	Nr	Pyrogenes / 100

^a Nr: no reactivo

Se evaluó el grado de concordancia entre los métodos diagnósticos MAT locales y MAT referencia mediante la Índice Kappa de Cohen. El análisis se realizó sobre 58 muestras en las que ambos métodos fueron aplicados de manera paralela. El acuerdo observado fue del 86,21%, mientras que el acuerdo esperado por azar fue del 62,43%. El Índice Kappa resultante fue de 0.63, con un valor de $p = 0.00$. Según la clasificación de Altman (1991), este valor indica un acuerdo “bueno” entre ambos las cepas participantes.

Tabla 4. Índice Kappa entre el MAT de cepas de referencias y Locales

Acuerdo	Acuerdo Esperado	Kappa	Error estándar	Z	Prob>Z
86,21%	62,43%	0,63	0.12	5,25	0.00

Al evaluar la sensibilidad y especificidad de los métodos MAT cepas de referencia y MAT cepas de local, se obtuvo que MAT cepas de referencia presentó una sensibilidad menor y una misma especificidad respecto al MAT de cepas locales (tabla 5 y 6). Estos resultados muestran que, si bien ambos métodos son igualmente precisos para identificar correctamente los negativos, el MAT de cepas local tiene una capacidad significativamente superior para detectar positivos bajo las condiciones del estudio. No obstante, considerando el reducido tamaño muestral, se recomienda realizar estudios adicionales n mayor de muestras para confirmar la robustez de estas estimaciones.

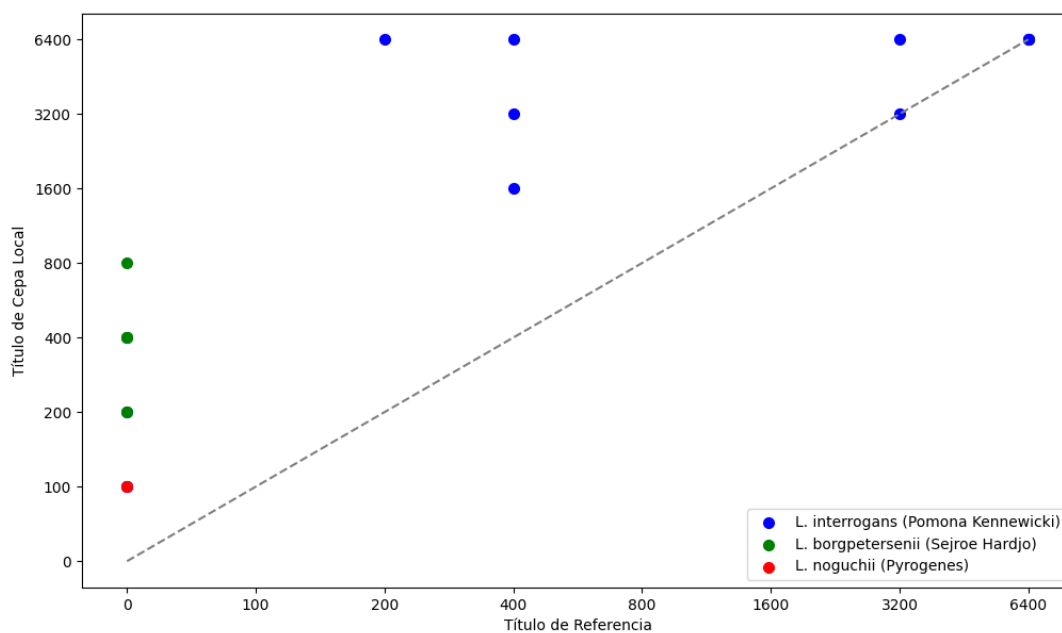
Tabla 5. Sensibilidades y Especificidades para MAT con cepas de referencia

MAT	Infectado	No Infectado	Total
Positivo	10	0	10
Negativo	8	40	48
Total	18	40	58
95 % I.C.			
Sensibilidad	55,60%	30.80%	78.50%
Especificidad	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 6. Sensibilidad y Especificidad para MAT con cepas locales

MAT	Infectado	No Infectado	Total
Positivo	18	0	18
Negativo	0	40	40
Total	18	40	58
95 % I.C.			
Sensibilidad	100,00%	81,50%	100,00%
Especificidad	100,00%	91,2%	100,00%

Figura 1. Máximos títulos de 1/100 a 1/6400 en la prueba de MAT para cepas locales y de referencias.



Discusión

Diferentes autores han estudiado la sensibilidad y especificidad de la prueba MAT frente a cepas que circulan localmente en un país o región.

Sarmiento y col (2012) obtienen resultados favorables respecto al aumento de sensibilidad utilizando cepas de circulación local. Un estudio en 85 municipios brasileiros de los estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina y Sao Paulo, procesaron 9.820 sueros bovinos obteniendo 5.806 (59,12%) reactivos en MAT para al menos un serovar utilizando los 23 serovares de referencia en cambio cuando emplearon la colección de serovares de referencia y las diez cepas locales, encontraron seroreacciones en 6.400 (65,24%), siendo la diferencia significativa ($p=0,001$). La adición de cepas locales a la colección de antígenos MAT permitió confirmar el diagnóstico de leptospirosis en 594 bovinos (6%) más que fueron clasificados como no reactivos por la colección de referencia ($p=0,001$) (Sarmiento y col 2012),

Pinto y col (2015) colectaron muestras de sangre y orina de 314 bovinos de varios rebaños de Río de Janeiro, Brasil. El diagnóstico serológico se realizó con MAT utilizando un panel de 21 cepas de referencia (MAT21) y un panel adicionando 12 cepas locales (MAT33). En MAT33, 65,0 % de los animales fueron seroreactivos con un aumento significativo de la seroreactividad del 9,9%. En conclusión, MAT presentó un aumento significativo de sensibilidad cuando se utilizaron cepas locales como antígenos. Entre las cepas locales serogrupo Shermani y serogrupo Grippotyphosa demostraron ser más antigénicas.

Sohm y col (2024) en Australia asilaron la serovar Hardjobovis la cual incluyeron en el panel de MAT del diagnóstico de rutina, mejorando el rendimiento del diagnóstico.

Clinton y col (2011) en Egipto analizaron sueros de seres humanos obtenido de 41 pacientes con fiebre utilizando un panel estándar de 24, estudiaron la sensibilidad de la prueba de MAT en pacientes con aislamientos locales de animales y humanos. Sólo un paciente tuvo un resultado positivo utilizando un panel regional o un MAT desarrollado con la serovar aislada del propio paciente. Sin embargo, el serovar con los títulos más

altos no coincidió con el serovar cultivado, por tanto, los autores concluyen que los MAT específicos de una región no parecieron ser confiables en la detección de infección o en la identificación del serovar infectante.

En nuestro estudio, se pudo evidenciar un aumento en sensibilidad del MAT respecto al uso de cepas locales vs de referencia. Si bien ambos métodos mostraron una alta especificidad, la diferencia en sensibilidad observada podría tener implicancias importantes en contextos donde es fundamental reducir el número de falsos negativos, como en vigilancia epidemiológica o diagnóstico temprano. Sin embargo, es importante señalar que el tamaño reducido de la muestra (58 muestras) limita la generalización de estos resultados. Para confirmar esta diferencia significativa en la sensibilidad, sería necesario realizar estudios con un número mayor de muestras que permitan obtener una estimación más robusta de la efectividad de ambos métodos. Lo que destaca de los resultados del estudio es la diferencia en los títulos de MAT, siendo más altos cuando se usa la serovar infectante versus la misma serovar de referencia.

Conclusión

La MAT presentó un aumento de sensibilidad cuando se utilizaron cepas locales como antígeno. Esta inclusión podría detectar animales positivos que actualmente no están siendo detectados por las cepas de referencia lo que redundaría en una detección temprana de la enfermedad. Sin embargo, es necesario realizar estudios con un número mayor de muestras que permitan obtener una estimación más robusta. Así mismo, existió una diferencia en los títulos de MAT, siendo más altos cuando se usa la serovar infectante versus la misma serovar de referencia, importante para detectar infecciones tempranas y/o crónicas en predios infectados. Teniendo en cuenta estos hallazgos podría ser necesario seguir profundizando en esta dirección para poder llegar a una conclusión que redunde positivamente en el diagnóstico de esta enfermedad en nuestros rodeos.

Bibliografía

1. Adler, B. (2015). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Monash University Clayton, VIC, Australia: Springer.
2. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4).
3. Altman, D. G. (1991). *Practical statistics for medical research*. New York: Chapman and Hall.
4. Aymée, L., Mendes, J., & Lilenbaum, W. (2024). Bovine Genital Leptospirosis: An Update of This Important Reproductive Disease. *Animals*, 14(2), 322.
5. Balboni, A., D'Incau, M., Zamagni, S., Lucchese, L., Mazzotta, E., Marchione, S., Battilani, M., & Natale, A. (2023). Identification of the most effective serovars to be included in the MAT antigen panel to optimize the serodiagnosis of *Leptospira* infection in Northern Italy. *Veterinary research communications*, 47(4), 2185–2192.
6. Blanco, R. M., dos Santos, L. F., Galloway, R. L., & Romero, E. C. (2016). Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 44, 34-36.
7. Bolin C. (2003). *Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis*. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference March 12-14, Reno, NV 155-159.
8. Ellis, W. A., Songer, J. G., Montgomery, J., & Cassells, J. A. (1986). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *The Veterinary Record*, 118, 11-13.
9. Goris, M. G., & Hartskeerl, R. A. (2014). Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Current Protocols in Microbiology*, 32, Unit 12E.5.
10. Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C. A., Dalmau, E. A., & Quintero, G. M. 2011. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of microbiological methods*, 84(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.021>

11. Levett, P. N. (2003). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 36(4), 447-452.
12. Libonati, H., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2017). Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. *Microbial Pathogenesis*, 108, 101-103.
13. Limmathurotsakul, D., Turner, E. L., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J., Suputtamongkol, Y., Chierakul, W., Smythe, L. D., Day, N. P., Cooper, B., & Peacock, S. J. (2012). Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55(3), 322–331.
14. Manual Terrestre de la OMSA. (2021). Leptospirosis. Capítulo 3.1.1.2. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Letopspirosis.pdf
15. McBride, A.J., Santos, B.L., Queiroz, A., Santos, A.C., Hartskeerl, R.A., Reis, M.G., & Ko, A.I. (2007). Evaluation of Four Whole-Cell *Leptospira*-Based Serological Tests for Diagnosis of Urban Leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 1245 - 1248.
16. Mughini-gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., & Marangon, S. (2014). Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiology and Infection*, 142(6), 1172–1181.
17. Murray, C. K., Gray, M. R., Mende, K., Parker, T. M., Samir, A., Abdel Rahman, B., Habashy, E. E., Hospenthal, D. R., & 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.
18. Musso, D., & La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(4), 245–252.
19. OMS. (2022). Spanish - WHO PH Labs Webinar 220323 - Epidemiología y pruebas de diagnóstico de la leptospirosis. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=wQhCSwWA8lQ>

20. Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1–9.
21. Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B., & Lilenbaum, W. (2015). Usage of *Leptospira spp.* local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Tropical*, 149, 163–167.
22. Sarmiento, M. C., Azevedo, S., Morais, Z. M., Souza, G. O., Oliveira Gonçalves, A., Miraglia, F., & Vasconcellos, S. (2012). Use of *Leptospira spp.* strains isolated in Brazil in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of leptospirosis in cattle herds in eight Brazilian states. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(7), 601-606.
23. Smythe, L. D., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Slack, A. T., Apiwattanaporn, A., Chueasuwanchai, S., Day, N. P., & 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.
24. Sohm, C., Willixhofer, D., Fasching, E., Waldner, K., Deitzer, N., Steiner, J., Jöbstl, J., Schleicher, C., Schwarz, M., Fuchs, R., Bourhy, P., Käsbohrer, A., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2024). First isolation and genotyping of pathogenic *Leptospira spp.* from Austria. *Scientific Reports*, 14(1), 1–9.

Capítulo 2. Estimar la seroprevalencia de leptospirosis a nivel de vacas lecheras y de rebaños del Uruguay.

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira* (Picardeau y col., 2017).

La infección por el género *Leptospira* se ha reportado en numerosas especies animales, incluyendo animales domésticos como bovino, ovino, porcino, equino y canino y una amplia variedad de animales silvestres, roedores, murciélagos, zarigüeyas, ciervos, mangostas, etc. (Ellis, 2015; Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y col, 2003).

La infección por *Leptospira spp.* ocurre a través de abrasiones de la piel o mucosas de forma directa a partir de orina contaminada de animales portadores o indirectamente por contacto con agua o suelo contaminado (Bharti y col., 2003). En un ecosistema particular, cada huésped animal se divide en hospedador de mantenimiento o incidental (Ellis, 2015; Levett, 2001), esta característica determina el tipo de manifestaciones clínicas y la epidemiología de la enfermedad. En una población, la ocurrencia de la enfermedad por diversos serovares depende de la prevalencia, densidad de huéspedes domésticos y silvestres, factores ambientales y climáticos, así como política de vacunación (Dreyfus y col, 2016).

En bovinos pueden ocurrir tres formas clínicas: aguda, subaguda o crónica. Los animales jóvenes son los más susceptibles a la leptospirosis aguda (Ellis, 2015, Radostits y col, 2002). En el ganado adulto puede producirse aborto, mortinatos o nacimientos de terneros débiles. En vacas lactantes puede ocurrir el síndrome de caída de la producción de leche, que se caracteriza por una disminución repentina en la producción y por una ubre flácida sin calor ni dolor (Radostits y col. 2002).

La serovar (sv.) de *Leptospira spp.* más comúnmente reportada en bovinos es la serovar Hardjo, donde el ganado es el huésped de mantenimiento (Grooms, 2006; Levett, 2001). Dos tipos de sv. Hardjo han sido identificadas *Leptospira interrogans* sv. Hardjo (tipo Hardjoprajitno) y *L. borgpetersenii* serovar Hardjo (tipo Hardjobovis) (Grooms, 2006; Levett, 2001). También se han reportado otras serovares como es el caso de la

serovar Pomona y Kennewicki. En Uruguay las variantes que circula en nuestros rodeos son la sv. Hardjobovis, y sv. Kennewicki, dichas serovares se han aislado en animales clínicamente enfermos, pero también en animales sanos a campo y frigoríficos (Zarantonelli y col, 2018). Así mismo en nuestro país, pero en menor proporción, se han aislado variantes de *L. interrogans* sv. Canicola y *L. noguchii* serogrupo Australis, Autumanlis y Pyrogenes (Zarantonelli y col, 2018).

A nivel mundial la leptospirosis es una enfermedad ampliamente extendida existiendo diferencias geográficas en la distribución de los diferentes serovares (Thiermann, 1984). La prevalencia de la enfermedad varía ampliamente entre los distintos países, e incluso entre regiones de un mismo país (Alonso-Andicoberry y col, 2001). Se ha informado una alta prevalencia de sv. Hardjo en los rodeos bovinos particularmente en Latinoamérica y el resto del mundo (Leonard y col., 2004; Salgado y col., 2014, Pinto y col., 2016; Sohm y col, 2023).

El MAT continúa siendo la prueba de elección para el diagnóstico de la enfermedad, aunque tiene sus limitaciones cuando se trata de fase temprana de infección en casos agudos y en casos crónicos con serovares adaptadas al huésped (OMSA 2021). En los casos crónicos por ejemplo con el sv. Hardjo en el bovino se han reportado sensibilidades de 41% utilizando el punto de corte 1/100 por lo cual se sugiere su utilización como una prueba de rodeo (Adler, 2015; OMSA, 2021). Esta prueba no es muy útil para determinar el estado del portador, ya que los portadores, comprobados bacteriológicamente, pueden ser MAT negativos (Faine y col., 1999). Sin embargo, el MAT es la prueba mayormente usada y reportada en la bibliografía para estudios epidemiológicos (Pinto y col., 2016. Levett, 2001). Algunos investigadores cuestionaron que el MAT tuviera la capacidad de diferenciar entre serovares (Levett, 2001). Smythe y col. (2009) concluyeron que la MAT no era específica de serovares cuando se realizó un estudio con el objetivo de determinar si MAT proporcionaba una guía precisa para las serovares infecciosas de *Leptospira spp.* en Tailandia, concluyendo que la misma era más precisa a nivel de serogrupo.

La leptospirosis asociada al ganado se describe como un riesgo de salud pública ocupacional sobre todo para trabajadores que realizan labores en contacto estrecho con

animales infectados como ser trabajadores rurales, profesionales veterinarios y trabajadores de mataderos (Levett, 2001; Schelotto y col 2012; Dreyfus y col., 2016).

Los últimos antecedentes nacionales en sistemas lecheros fueron reportados por Gil y col, (2001), los investigadores realizaron un monitoreo de salud animal en la cuenca sur de Uruguay, reportando una seroprevalencia de 14 % en bovinos de leche y de 61,5 % a nivel predial. Posteriormente un nuevo muestreo del año 2003 reporta seroprevalencias individuales de 22,63 % y 60,60 % a nivel individual y predial (Gil A, comunicación personal 2003). Repiso y col. (2005), informan prevalencias en Uruguay en ganado de carne de 38,5 % a nivel individual y de 71,2 % a nivel predial, predominando los serovares Hardjo y Wolffi. Easton (2006), en un estudio sobre las principales causas infecciosas de abortos en bovinos, demuestran que en 99 de 431 fetos estudiados se detectaron anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira* spp. en líquido fetal, en suero materno o en ambos.

En los últimos años la enfermedad ha tomado un papel preponderante como tema de interés de investigación en Salud Animal. Además se han logrado avances importantes en los conocimientos de las variedades que circulan en nuestros rodeos. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue estimar la seroprevalencia de leptospirosis a nivel de vacas y de rebaños lecheros del Uruguay usando cepas de referencia y aislamientos locales.

Materiales y Métodos

Para determinar la seroprevalencia de *Leptospira* spp. se realizó un estudio transversal. Para la selección de la muestra se utilizó como marco la Declaración Jurada DICOSE 2014, se seleccionaron todos los bovinos lecheros del Uruguay trazados de forma individual, lo que incluyó 695.811 bovinos lecheros, pertenecientes a 3.042 establecimientos. Las muestras fueron colectadas en 101 rodeos lecheros de todo el país totalizando en 4269 bovinos hembra. El muestreo se llevó a cabo en el segundo semestre del año 2015 a través de un diseño de muestreo aleatorio estratificado en dos etapas (Figura 1). En la primera etapa se seleccionaron los establecimientos dentro de 3 estratos según tamaño de la población bovina de la lechería: de 1 a 50, de 51 a 250 y más de 250 bovinos y se tomó un número fijo de establecimientos por estrato (Tabla 1), de forma de poder estimar el intervalo de confianza en cada uno de ellos con tamaños de muestra

Tabla 1. Distribución de las categorías, total de predios y tamaño de muestra según estrato en establecimientos lecheros. (UNEPI, MGAP, 2014)

Estrato ^a (Lecheros)	Bovinos	Vacas	Predios	Muestreados	
				Vacas ^b	Predios ^c
1 - 50	19438	13491	626	702	32
51 - 250	206447	143548	1670	1704	36
> de 250	469926	317170	746	1863	33
Total	695811	474209	3042	4269	101

a Los estratos se determinaron en función de la población de bovinos de cada rebaño.

b Hembras adultas.

c Número de rebaños por estrato seleccionados para el muestreo.

Análisis de laboratorio

Los sueros se procesaron por la prueba de MAT. Se utilizaron 11 serovares, 5 del cepario de referencia (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) y 6 aislamientos locales de Uruguay (Tabla 2).

Tabla 2. *Leptospira* spp. utilizadas en la prueba de MAT.

Género	Especie	Serogrupo	Serovar	Origen
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pomona	Pomona	Referencia
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pomona	Kennewicki	Autóctona
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Referencia
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Canicola	Canicola	Referencia
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Referencia
<i>Leptospira</i>	<i>borpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo-bovis	Referencia
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	Pyrogenes	ND	Local Uy
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	Autumanlis	ND	Local Uy
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	Australis	ND	Local Uy
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	ND_1	ND	Local Uy
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	ND_2	ND	Local Uy

ND: no determinadas

Uy: Uruguay

Un animal fue considerado seropositivo cuando alcanzó un título de MAT ≥ 100 contra cualquiera de los serovar del panel seleccionado. Un establecimiento fue considerado positivo si presenta al menos un animal seropositivo del total de muestras

analizadas. Un animal fue considerado negativo si no reacciono a ninguna *Leptospira spp.* a un título <100 y un rodeo fue considerado negativo si todos los animales muestreados no presentaron títulos para la enfermedad.

Para realizar la prueba de MAT el cepario se mantuvo en medio de cultivo líquido EMJH enriquecido con albumina bovina. Los tubos con medio inoculados con las diferentes serovares se mantuvieron en estufa a 29°C durante 7 días hasta que la turbidez del medio alcance 1×10^8 leptospiras /ml. Todas las serogrupos/serovares de *Leptospira spp.* fueron chequeadas con sueros hiperinmunes de referencia previo a su utilización.

Análisis estadístico

Los análisis de los resultados se realizaron teniendo en cuenta el diseño del muestreo, para lo cual se utilizó rutinas para muestreos complejos del paquete estadístico STATA/IC 2015 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). La probabilidad de selección de los establecimientos y animales fueron considerados para ponderar los análisis y proyectar las estimaciones a la población general, además se tuvo en cuenta el efecto “cluster” de los animales dentro de los establecimientos.

La prevalencia reportada en esta tesis es la prevalencia aparente; por lo tanto, no calculamos la prevalencia real con la fórmula de Rogan-Gladen para ajustar ya que los reportes en la literatura también se reportan de esta forma (Rogan y Gladen, 1978).

Primariamente se desconocía el estatus de vacunación de los predios seleccionados en el muestreo. El dato fue recolectado través de un formulario encuesta (Capítulo 3). Así mismo teniendo en cuenta que la prueba de MAT no diferencia títulos vaccinales de los de infección, para determinar la prevalencia, se tuvo en cuenta los antecedentes de vacunación de los animales. Para ello se aplicó la prueba de Chi² donde se estableció la relación entre los individuos vacunados y la probabilidad de ser seropositivos a la prueba de MAT.

Resultados

Prevalencia a nivel individual

Se tomaron muestras de sangre en 101 predios lecheros y 4269 bovinos de leche. El dato de vacunación que se registró a partir de la encuesta se muestra en la Tabla 3. El 92% de los predios declararon el estatus de vacunación. Como se puede observar en la Tabla 3 el estrato > 250 animales fue donde más se registró el evento vacunación.

Tabla 3. Proporción de establecimientos que vacunan contra Leptospirosis.

Vacunación	Estratos (número de animales)			
	1-50 %	51-250 %	>250 %	Total
No	75,86 (22)	75,76 (25)	20,00 (06)	57,61 (53)
Si	24,14 (7)	24,24 (8)	80,00 (24)	42,39 (39)
Total	100 (29)	100 (33)	100 (30)	100 (92)

La estimación de la seroprevalencia aparente (PA) en bovinos lecheros del Uruguay fue de $38,38 \pm 2,90$ % (media $\pm$ error estándar), siendo el intervalo de confianza (IC 95%) de 32,60 a 44,16 % La Tabla 4 muestra las PA a nivel de estratos donde se observa que la diferencia entre estratos fue significativa ($p < 0,05$). El estrato que presentó una mayor proporción de animales seropositivos fue el de > 250 animales respecto al resto.

Tabla 4. Prevalencia aparente distribuida en 3 estratos.

Estrato	Media	Error		
		Estándar.	IC* 95%	
1-50	32,16	6,33	19,60	44,72
51-250	29,05	2,92	23,24	34,86
>250	43,79	4,23	35,39	52,19

*Intervalo de confianza.

$P < 0,05$

Debido a que la prueba de MAT no diferencia anticuerpos vacunales de los de infección se realizó una prueba de χ^2 entre la variable que contiene el estatus serológico

a la prueba MAT y los antecedentes de vacunación. La prueba de χ^2 mostró un $\chi^2=94$ con $p= 0.0025$, por tanto, la hipótesis nula de independencia es rechazada.

A partir de este dato se realizó el cálculo de la seroprevalencia en predios sin antecedentes de vacunación. La PA en predios no vacunados fue de $27,80 \pm 3,3 \%$ (media $\pm$ error estándar), siendo el intervalo de confianza (IC 95%) de 21,06 a 34,54 %. Si se compara con la PA global, existe una reducción de un 17,32% entre ambos valores. En la Tabla 5, se puede observar la proporción de seropositivos por estrato en predios no vacunados, la diferencia entre estratos no resultó significativa ($p=0,70$). Sin embargo, existió una reducción marcada en el estrato > 250 animales respecto a la proporción de seropositivos global (Tabla 4).

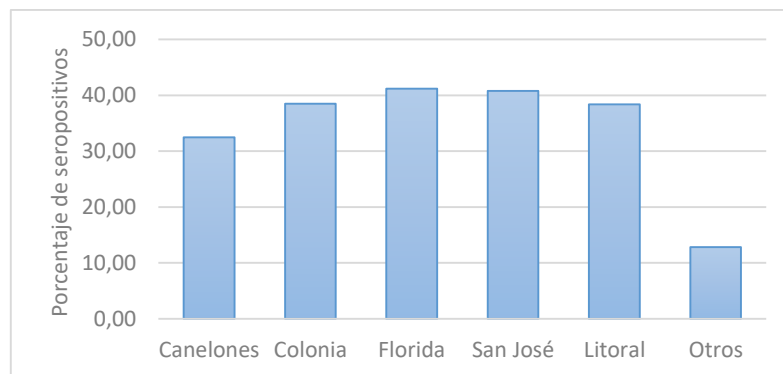
Tabla 5. Prevalencia aparente distribuida en 3 estratos en establecimientos sin antecedentes de vacunación.

Estratos	Media	Error Estándar.	IC* 95%	
1-50	32,62	7,99	16,59	48,65
51-250	28,56	4,28	19,98	37,15
>250	24,21	6,60	10,96	37,45

*Intervalo de confianza. $p=0,70$

La figura 2, muestran la distribución de seroprevalencia global individual cuando se realiza la zonificación del muestreo, no encontrándose diferencias significativas entre las mismas.

Figura 2. Distribución de seroprevalencia individual global por departamentos.



$p= 0,30$

Litoral: Paysandú, Río Negro, Salto, Soriano

Otros: Durazno, Flores, Rocha, Cerro Largo

Las Tablas 6 muestra con y sin vacunación, y 7 muestran las seroprevalencias globales sin antecedente de vacunación por serogrupo/serovar estudiadas. Cuando se comparan los resultados serológicos de animales con y sin antecedentes de vacunación, se puede observar que existen 2 serovares, Hardjo-bovis y Canicola y un serogrupo Australis donde el test de χ^2 no rechaza la hipótesis de igualdad de prevalencias entre los animales con y sin antecedentes de vacunación.

En la Figura 3 se presentan las seroprevalencias intraprediales, donde se observa que la mayoría de los rebaños lecheros cuentan con seroprevalencias de 20 a más de 60%. Encontrándose un bajo número de rebaños negativos (sin animales reaccionantes). La amplitud de variación fue entre 0 y 81,8 %, con una mediana de 35,79%.

Figura3. Distribución de predios lecheros del Uruguay según su seroprevalencia intrarodeo de *Leptospira spp.*

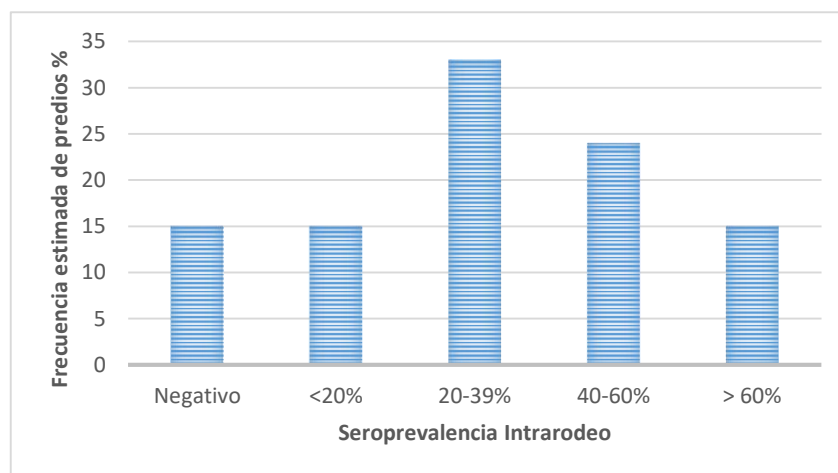


Tabla 6. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* por serogrupo/Serovar en toda la población general muestreada

Serogrupos/Serovares	Media	Error Estándar.	IC* 95% ^a	
Pomona	18.37	1.86	14.67	22.07
Hardjobovis	18.35	2.80	12.80	23.90
Kennewicki	18.22	1.55	15.15	21.29
Autumnalis	5.42	0.86	3.72	7.13
Grippotyphosa	3.48	1.24	1.01	5.94
Lnoguchii_ND_2 ^b	3.16	1.11	0.96	5.36
Icteroaemoragiae	2.45	1.10	0.26	4.64
Australis	1.77	0.38	1.02	2.51
Canicola	1.66	0.67	0.33	2.98
Lnoguchii_ND_1 ^b	0.48	0.23	0.02	0.95
Pyrogenes	0.08	0.03	0.01	0.15

^a IC Intervalo de Confianza

^b ND No determinada, solo identificación de especie.

Tabla 7. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* por serogrupo/Serovar en población sin antecedentes de vacunación

Seogrupos/Serovares	Media	IC* 95% ^a	
Hardjobovis	14.84	10.49	19.18
Kennewicki	10.49	6.64	14.34
Pomona	9.36	5.44	13.28
Autumnalis	3.30	1.30	5.30
L.noguchii_ND_2 ^b	1.80	0.71	2.88
Canicola	1.50	0.30	3.31
Australis	1.39	0.58	2.20
Grippotyphosa	0.85	0.50	2.20
L.noguchii_ND_1 ^b	0.33	-0.07	0.73
Pyrogenes	0.21	0.02	0.41
Icteroaemoragiae	0.15	0.15	0.46

^a IC Intervalo de Confianza

^b ND No determinada, solo identificación de especie.

Los títulos de anticuerpos en animales no vacunados se muestran en las figuras 4 y 5. Los títulos oscilaron entre 1:100 y 1:6400 para los serovar Hardjobovis, Pomona y Kennewicki. En cuanto los títulos para las serovares incidentales fueron de 1:100 hasta 1:1600, en ambas gráficas se puede observar que el título más frecuente es 1:100 para

todas las serovares aun que en las serovares más prevalentes los títulos toman valores mayores hasta alcanzar 1:6400. (Figura 4 y 5)

Figura 4. Títulos de anticuerpos para las serovares Hardjobovis, Pomona y Kennewicki

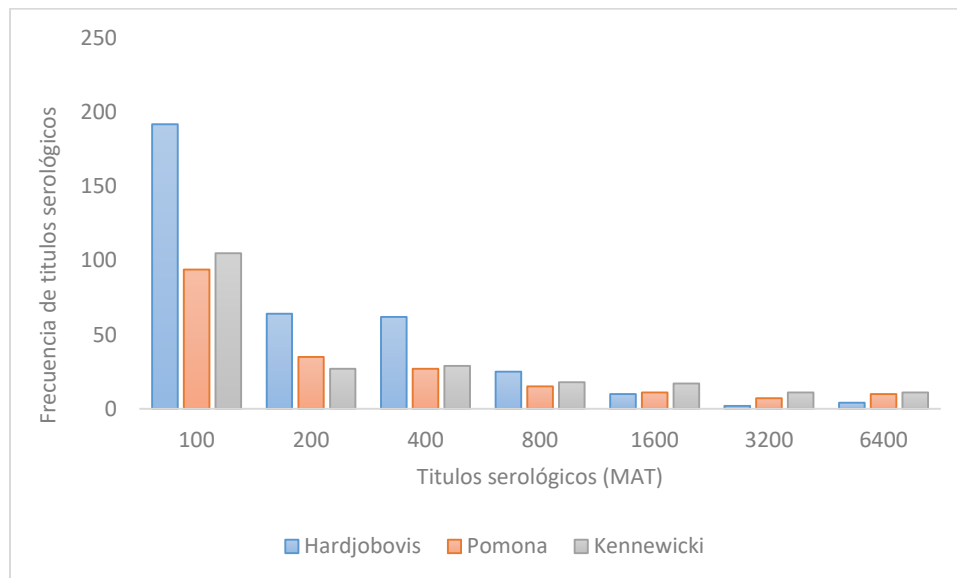
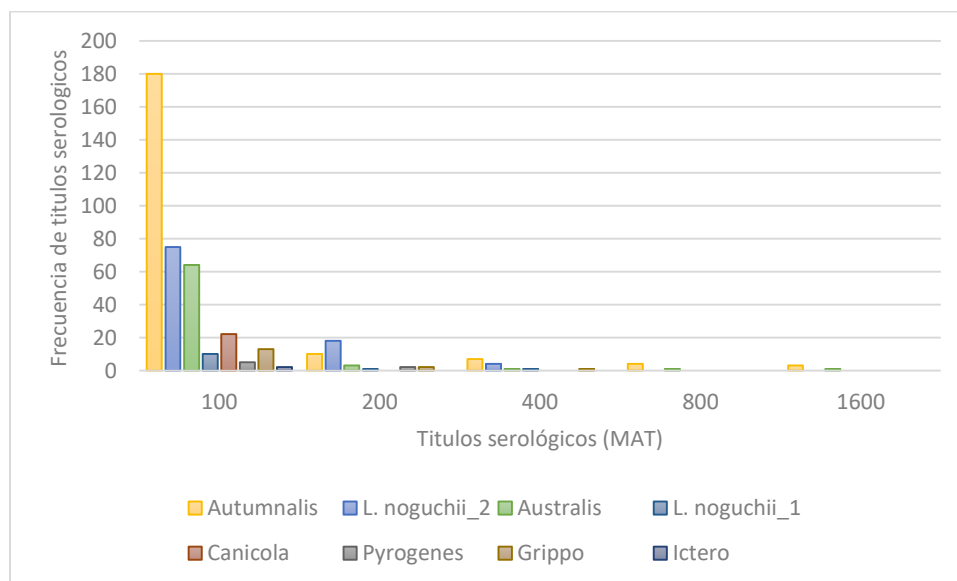


Figura 5. Títulos de anticuerpos para las serovares incidentales



Análisis a nivel de establecimiento.

La seroprevalencia de Leptospirosis a nivel de establecimientos fue de $86,92 \pm 3,4\%$ (media $\pm$ error estándar), siendo el intervalo de confianza (IC 95%) de 80,00 a 93,75%. En la Tabla 8 se observa la prevalencia por estrato, mostrando que sus valores están asociados a los estratos en forma significativa ($p < 0.05$), existe una tendencia de

aumentar la prevalencia a medida que el tamaño poblacional aumenta. La Tabla 9 muestra la seroprevalencia predial por serogrupo/serovar, estos datos estarían mostrando una amplia distribución de muchas de las serovares seleccionadas, sobre todo las de seroprevalencias de establecimiento mayores a 20%.

Tabla 8. Prevalencia aparente a nivel de establecimiento distribuida por estratos.

Estratos	Media	Error Estándar.	IC* 95% ^a	
1-50	69,70	8,12	53,57	85,81
51-250	88,98	5,31	78,34	99,42
>250	96,69	3,03	90,95	100

^a IC Intervalo de Confianza

Tabla 9. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* por Serogrupo/Serovar a nivel de establecimientos sin antecedentes de vacunación

Serogrupo/serovar	Media	Error Estándar.	IC* 95% ^a	
Hardjobovis	66.57	6.55	53.44	79.71
Pomona	56.31	7.24	41.79	70.84
Kennewicki	55.38	7.93	39.48	71.28
Autumnalis	42.64	7.25	28.10	57.18
Australis	26.42	6.57	13.24	39.59
Lnoguchii_ND_2	15.36	5.32	4.68	26.04
Canicola	14.08	5.27	3.51	24.66
Lnoguchii_ND_1	6.51	3.84	-1.19	14.21
Grippotyphosa	6.30	3.78	-1.27	13.88
Pyrogenes	6.30	3.78	-1.27	13.88
Icterohaemorrhagiae	c	c	c	c

^a IC Intervalo de Confianza

^b ND No determinada, solo identificación de especie.

^c No detectada

Discusión

Este es el primer estudio de seroprevalencia en bovinos de leche que incluyó todo el territorio nacional. Si bien existen antecedentes de estudios de prevalencia en ganado bovino, los mismos fueron restringidos a determinadas zonas lecheras del Uruguay. El objetivo de este estudio fue evaluar la seroprevalencia de *Leptospira spp.* en ganado bovino lechero de todo el territorio nacional. El muestreo diseñado para este estudio incluyó bovinos hembra mayores de 2 años, lo cual excluyó animales jóvenes (terneros)

y machos. Por tanto, este estudio parte de algunas diferencias de otros diseños de muestreo de estudios nacionales, difiriendo en el: giro, población de referencia, diseño de muestreo y sexo (Repiso y col, 2005). Otra diferencia fue el título de corte utilizado para la prueba de MAT, en el presente estudio se usó un título de corte de 1:100 para definir un animal positivo, otros estudios nacionales utilizaron títulos mayores (1:200) (Gil y col, 2003; Repiso y col, 2005; Grooms y Bolin, 2005; Zarantonelli y col, 2018). Un estudio anterior en ganado lechero (Gil y col 1998), realizado en la cuenca lechera sur de Uruguay, reportó una seroprevalencia individual de 14 % y de 61,5 % a nivel de establecimientos con títulos de MAT de 1:200. Un trabajo posterior también en la cuenca lechera sur realizado en el periodo 2001 al 2003 mostró una seropositividad en vacas lecheras de 22,63% y una prevalencia a nivel de establecimiento de 60,6% (Gil A, comunicación personal 2003). El diseño de muestreo en estos estudios fue diferente al de la presente tesis, así como el título de corte elegido (1:200) y sumado al tiempo transcurrido entre los reportes y las variaciones ambientales, estos factores podrían explicar las diferencias en los valores de seroprevalencias encontradas. A pesar de esto, si comparamos los resultados de los estudios del 1998, 2003 y 2015 en ganado lechero vemos que ha habido un incremento importante en la seroprevalencia a nivel individual y predial de la leptospirosis en el Uruguay.

Los resultados de este estudio fueron mostrados con y sin antecedentes de vacunación, ya que cuando se realizó el análisis la diferencias eran importantes (17%), y por tanto creemos que esta práctica está sobreestimado la exposición real de la enfermedad en los animales vacunados. Algunos autores han discutido este tema y han optado por reportar la seroprevalencia global sin la discriminación de antecedentes de vacunación. Estos autores atribuyen su decisión al hecho de que los títulos de anticuerpos debidos a la vacunación pueden ser bajos y disminuir más rápidamente que los de la infección natural (Strother, 1974; Dreyfus y col, 2016) y, por tanto, no deben sesgar la seroprevalencia en un estudio transversal (Dreyfus y col, 2016). Si bien este hecho fue discutido, en nuestro estudio no contábamos con fechas de vacunación y consideramos que la diferencia estimada fue importante y por tanto podría ser relevante mostrar las diferencias.

En el contexto global se observa que ha habido un incremento sustantivo de los establecimientos con alta prevalencia en detrimento o disminuyendo los establecimientos

de prevalencias menores a 20 % . A nivel internacional, numerosos autores han reportado estudios de seroprevalencia de Leptospirosis bovina y aunque la prueba de MAT tiene algunas limitaciones, sigue siendo la herramienta más utilizada para estudios epidemiológicos (Suepaul y col. 2011; Pinto y col, 2016). Pinto y col (2016) realizaron una revisión sistemática de la leptospirosis bovina en Latinoamérica, con el fin de proporcionar datos sobre seroprevalencias de la enfermedad en esta región. Luego de revisar 98 artículos indexados en el periodo 1957 a 2014 llegaron a la conclusión que existe en promedio una alta seroprevalencia en esta región (75,0% predial y 44,2 % individual), con predominio del serogrupo Sejroe (80,3%) (Pinto y col, 2016). La seroreactividad encontrada frente a la serogrupo Sejroe tampoco es sorprendente, ya que los bovinos pueden actuar como reservorios de ese agente (Mughini-Gras y col. 2014; Ellis, 2015). Otros autores han publicado estudios de seroprevalencias en otros países siendo los resultados muy variados en el rango de 6 a 82% (Ryan y col, 2012; Dreyfus y col 2017; Sanhueza y col, 2017; Miyama y col, 2018; Alonso-Andicoberry y col, 2001).

Las serovares seleccionadas en los anteriores estudios nacionales no coinciden en su totalidad a los elegidos en la presente tesis. Este trabajo contó con la fortaleza de conocer cuales serogrupos/serovares circulan en nuestro país y estas variantes fueron seleccionadas e incluidas para realizar la prueba de MAT. Por tanto, esta tesis tomó parte de los aislamientos locales y los incluyó en el panel del MAT, las cepas seleccionadas fueron *L. interrogans* serogrupo Pomona sv. Kennewicki y *L. noguchii* con sus diferentes serogrupos (serogrupo Australis, Autumanlis, Pyrogenes y 2 aún sin determinar), se tomó como criterio de selección de cepas, que las mismas no estuvieran presentes en el cepario de referencia de DILAVE, MGAP (Zarantonelli y col, 2018; Nieves y col, 2019).

Gil A (comunicación personal 2003), encontraron en el muestreo longitudinal 2001-2002 una clara superioridad en la presencia del serovar Wolffi (33,69% y 11,31%) que diezmó en el muestreo trasversal del año 2003 donde hubo un equilibrio entre Wolffi y los serovares Pomona y Hardjo, siendo los porcentajes de positividad a nivel animal de los mismos, 8,49 %, 7,52 %, 7,26 % respectivamente. En nuestro estudio la serovar Wolffi no se incluyó en el panel de la prueba MAT. Actualmente se reconoce a la prueba de MAT como seroprupo específico y basados en esta definición se resolvió incluir solo una serovar que represente a cada serogrupo, en nuestro caso se eligió del serogrupo Sejroe la serovar Hardjo tipo bovis y no Wolffi, la cual ya sabíamos que circula en los bovinos

a nivel nacional (Adler y de la Peña Moctezuma 2010; Musso y Lascola, 2013; Zarantonelli y col, 2018; OMSA, 2021). Sobre este aspecto hicimos una excepción para el serogrupo Pomona, donde se seleccionaron 2 serovares de este serogrupo la sv. Pomona del cepario de referencia y la sv Kennewicki de los aislamientos locales. Esta decisión se tomó debido a que la sv. Kennewicki fue uno de los aislamientos autóctonos nuevos y nunca antes reportada en Uruguay, hecho que despertó el interés por contar con más información serológica al respecto. Pero como puede observarse en los resultados (Tablas 6 y 7) no hubo diferencias significativas entre las dos serovares del serogrupo Pomona (sv. Pomona y Kennewicki). Se pudo evidenciar una tendencia de Kennewicki sobre Pomona en animales sin antecedentes de vacunación, lo cual era esperable ya que la misma es un aislamiento local, y esto la haría más seroreactiva en la prueba de MAT (Pinto y col, 2015, capítulo 1). En países vecinos como Brasil y Argentina se reporta, a diferencia de Uruguay, que la serovariedad predominante en bovinos es serogrupo Pomona sv. Pomona y no Kennewicki (Draghi y col., 2011; Moreno y col., 2018; Pavan y col., 2008).

La serovar Hardjo (genoespecie *L. borgpetersenii*) generalmente se asocia con el bovino y se sabe que es el hospedador de mantenimiento. En esta tesis la seroprevalencia individual observada fue de 14,84 % en animales sin antecedentes de vacunación, siendo la serovar más prevalente. La transmisión del serovar Hardjo es posible a través de una infección placentaria o por contacto directo con la orina o las membranas fetales de bovinos infectados (Ellis, 2015). Esta serovar induce mayoritariamente una leptospirosis crónica, que puede provocar abortos, mortinatos o infertilidad en las hembras (Ellis, 2015). En Uruguay, se desconoce el impacto económico y en salud pública que esta variedad pueda estar ocasionado. En humanos hay reportes clínicos de Leptospirosis debido a serogrupo Sejroe pero no aislamientos de pacientes enfermos (Meny y col 2017). Zarantonelli y col (2018) reportan el aislamiento de esta serovar en muestras de orina de bovinos de leche y carne se obtuvieron 11 aislamientos de dicha variante. Aunque probablemente debido a su dificultad de adaptación en medios de cultivo, la tasa de aislamiento de Hardjo fue baja respecto a otros microorganismos del género *Leptospira* reportadas (Chideroli y col., 2017).

Los datos de seroprevalencia de las serovares incluidas en el panel de MAT, están en su mayoría presentes a nivel de establecimiento, este hecho indicaría un alto nivel de endemismo de Leptospirosis en Uruguay. A nivel de seroprevalencia individual

y restringido el dato en animales sin antecedentes de vacunación, los niveles de anticuerpos detectados sobre todo en los serovares Hardjobovis, Kennewicki y Pomona podrían hacer sospechar que en Uruguay existe un ciclo de transmisión crónico en ganado bovino lechero. En el ciclo epidemiológico de la leptospirosis ya está bien registrado el rol que tiene el bovino como huésped de mantenimiento de la serovar Hardjo además de mostrar un patrón de infección subclínico (Marshall y Manktelow, 2002). En el caso de la sv. Pomona y/o Kennewicki se la ha asociado al suino doméstico y silvestre (Bolt y col, 1995, Adler, 2015). Sin embargo, algunos autores han enunciado ya una posible asociación también con el ganado bovino y ovino como huésped de mantenimiento (Dreyfus col, 2016). Esta serovar no sería la única propuesta como adaptada al bovino, además de la ya clásica Hardjo, trabajos en Nueva Zelanda proponen a la serovar Tarassovi como posible variedad adaptada al ganado bovino. Los autores se basan en la ausencia de enfermedad clínica como el aborto en animales con aislamiento, junto con la proporción relativamente grande de vacas y rebaños seropositivos. En Uruguay la hipótesis de adaptación del serogrupo Pomona es reforzada por el estudio nacional previamente citado (Zarantonelli y col, 2018) donde se aíslan estas serovares con mucho mayor frecuencia que otras en el ganado bovino tanto a nivel de campo como a nivel de faena, esto último estaría indicado la adaptación de esta serovar en individuos sin manifestaciones clínicas. Así mismo la distribución de títulos en animales positivos se concentraron en títulos ≤ 200 y la seroprevalencia individual y de rodeo fueron altas, lo que pone en duda infecciones recientes. Aunque esta hipótesis amerita análisis más profundos en esta dirección.

La especie *Leptospira noguchii* ya ha sido registrada previamente en Latinoamérica, así como en otros países fuera de Latinoamérica. Se ha informado en diferentes hospedadores, tanto silvestres (Ballados González y col., 2018) como domésticos (Barragán y col., 2016; Silva y col., 2009; Zarantonelli y col, 2018) principalmente en América. También se ha descrito como causal de enfermedades en humanos (Silva y col., 2009). Dentro de la especie de *Leptospira noguchii*, el serogrupo más prevalente fue la Autumanlis seguida de las ND_2 y la Australis, el resto de los serogrupos tuvieron seroprevalencias menores a 1%. Si se comparan los niveles de seroprevalencia existe una concordancia en cuanto a las proporciones entre serología y los aislamientos locales de los mismos serogrupos/serovares (Zarantonelli y col, 2018). Aislamientos del serogrupo Autumnalis como Australis ya han sido reportados en la región,

específicamente en Brasil (Silva y col., 2009). El serogrupo Pyrogenes ha sido aislado en Brasil, pero en animales silvestres, como la comadreja (Santa Rosa y col., 1980). En Argentina también se ha reportado, pero en humanos (Chiani y col., 2016). Loureiro y col (2020) caracterizaron las variedades aisladas en Brasil los cuales pertenecen a serogrupos Australis, Autumnalis y Panama, las cuales mostraron una alta heterogeneidad de estas serovares.

Conclusión

Este estudio muestra una seroprevalencia alta a nivel predial de leptospirosis en Uruguay, lo que demuestra una alta exposición y endemismo de este microorganismo en el ganado lechero uruguayo. En rodeos grandes, los cuales implementan más vacunación es más difícil interpretar los resultados del MAT debido a la interferencia de la vacuna y la infección en los primeros meses postvacunación. Por tanto, es importante mantener registros claros y actualizados del manejo aplicado en los animales para poder realizar una buena interpretación de los resultados de laboratorio.

La prevalencia por serovar concuerdan con los aislamientos de campo que hay hasta la fecha, se confirma un predominio de las serovares Hardjo y Kennewicki en nuestro rodeo con presencia a nivel serológico de *Leptospira spp.* incidentales, pero en menor proporción, pero con amplia distribución a nivel predial. Hay que resaltar el posible riesgo para la salud pública especialmente en trabajadores rurales que puede ocasionar este escenario actual.

Bibliografía

1. Adler, B. (Ed.). (2015). Current Topics in Microbiology and Immunology. Australian Research Council Centre of Excellence in Structural and Functional Microbial Genomics, Monash University, Clayton, VIC, Australia: Springer.
2. Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. J., Pereira-Bueno, J., Costas, E., & Ortega-Mora, L. M. (2001). Herd-level risk factors associated with *Leptospira spp.* seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Preventive Veterinary Medicine, 52(2), 109–117.
3. Ballados-González, G. G., Sánchez-Montes, S., Romero-Salas, D., Colunga Salas, P., Gutiérrez-Molina, R., León-Paniagua, L., Becker, I., Méndez-Ojeda, M. L., Barrientos-Salcedo, C., Serna-Lagunes, R., & Cruz-Romero, A. (2018). Detection

- of pathogenic *Leptospira* species associated with phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera) from Veracruz, Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), 773–781.
4. Barragán, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J. M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., de la Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G., & Pearson, T. (2016). High *Leptospira* diversity in animals and humans complicates the search for common reservoirs of human disease in rural Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(9).
5. Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M., & Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757–771.
6. Bolt, I., & Marshall, R. B. (1995). The epidemiology of *Leptospira interrogans* serovar pomona in grower pig herds. *New Zealand Veterinary Journal*, 43(1), 10–15.
7. Chiani, Y., Jacob, P., Varni, V., Landolt, N., Schmeling, M. F., Pujato, N., & Vanasco, B. (2016). Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 245–251.
8. Chideroli, R. T., Gonçalves, D. D., Suphoronski, S. A., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., de Oliveira, A. G., de Freitas, J. C., & Pereira, U. P. (2017). Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2155.
9. Draghi, M. G., Brihuega, B., Benítez, D., Sala, J. M., Biotti, G. M., Pereyra, M., Homse, A., & Guariniello, L. (2011). Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina [Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina]. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 42–44.
10. Dreyfus, A., Dyal, J. W., Pearson, R., Kankya, C., Kajura, C., Alinaitwe, L., Kakooza, S., Pelican, K. M., Travis, D. A., Mahero, M., Boulware, D. R., & Mugisha, L. (2016). *Leptospira* seroprevalence and risk factors in health centre patients in Hoima District, Western Uganda. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8).
11. Dreyfus, A., Odoch, T., Alinaitwe, L., Rodriguez-Campos, S., Tsegay, A., Jaquier, V., & Kankya, C. (2017). Cross-sectional serological survey for

- Leptospira spp.* in beef and dairy cattle in two districts in Uganda. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(11), 1421.
12. Ellis, W. A. (2015). Animal leptospirosis. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and leptospirosis. Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 387, pp. 99–137). Springer.
 13. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira and leptospirosis* (2.^a ed.). Medisci Press.
 14. Gerritsen, M. J., Koopmans, M. J., Peterse, D., & Olyhoek, T. (1994). Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. American Journal of Veterinary Research, 55, 1232–1237.
 15. Giorgi, W., Genovez, M. E., Teruya, J. M., & Silva, A. S. (1984). *Leptospira interrogans*, sorotipo Wolffi, isolada de camundongo capturado no Porto de Santos, SP. O Biológico, 50(12), 295–297.
 16. Grooms, D. L. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. Theriogenology, 66(3), 624–628.
 17. Grooms, D. L., & Bolin, C. A. (2005). Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira spp.* Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 21, 463–476.
 18. Leonard, N., Mee, J. F., Snijders, S., & Mackie, D. (2004). Prevalence of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in bulk tank milk from unvaccinated Irish dairy herds. Irish Veterinary Journal, 57(4), 226–231.
 19. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews, 14(2), 296–326.
 20. Loureiro, A. P., Jaeger, L. H., Di Azevedo, M. I. N., Miraglia, F., Moreno, L. Z., Moreno, A. M., Pestana, C. P., Carvalho-Costa, F. A., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2020). Molecular epidemiology of *Leptospira noguchii* reveals important insights into a One Health context. Transboundary and Emerging Diseases, 67(1), 276–283.
 21. Magajevski, F. S., Girio, R. J. S., Mathias, L. A., Myashiro, S., Genovez, M. E., & Scarcelli, E. P. (2005). Detection of *Leptospira spp.* in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Brazilian Journal of Microbiology, 36, 43–47.

22. Manual Terrestre de la OMSA (2021). Leptospirosis. Capítulo 3.1.1.2. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Leptospirosis.pdf Fecha de consulta: 22/05/2021.
23. Marshall, R. B., & Manktelow, B. W. (2002). Fifty years of leptospirosis research in New Zealand: a perspective. *New Zealand Veterinary Journal*, 50, 61–63.
24. Meny, P., Menéndez, C., Quintero, J., Hernández, E., Ríos, C., Balassiano, I. T., Trindade, C. N. D. R., Vital-Brazil, J. M., Ramos, T. M. V., Ashfield, N., Feble, C., Avila, E., Schelotto, F., & 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.
25. Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., Urushiyama, Y., Kawahara, N., & Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 149, 15–20.
26. Moreno, L. Z., Miraglia, F., de Oliveira, C. H., Vasconcellos, S. A., Heinemann, M. B., & Moreno, A. M. (2018). Draft genome sequence of Brazilian *Leptospira interrogans* serovar Pomona strain GR5, isolated from apparently healthy gilt. *Genome Announcements*, 6(23), e00491-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00491-18>
27. Mughini-Gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., Patregnani, T., Lucchese, L., & Marangon, S. (2014). Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiology and Infection*, 142, 1172–1181.
28. Nieves, C., Ferrés, I., Díaz-Viraqué, F., Buschiazzi, A., Zarantonelli, L., & Iraola, G. (2019). Draft genome sequences of 40 pathogenic *Leptospira* strains isolated from cattle in Uruguay. *Microbiology Resource Announcements*, 8(47).
29. Pavan, M. E., Cairó, F., Brihuega, B., & Samartino, L. (2008). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(1), 37–45.
30. Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297–307.
31. Pinto, P. S., Libonati, H., Penna, B., & Lilenbaum, W. (2016). A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine

- leptospirosis in Latin America. *Tropical Animal Health and Production*, 48(2), 239–248.
32. Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B., & Lilenbaum, W. (2017). Detection of *Leptospira* in vaginal fluid and in uterus of slaughtered bovines with reproductive problems. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2), 431–435.
33. Plank, R., & Dean, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes and Infection*, 2, 1265–1276.
34. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (9th ed.). Madrid: Interamericana.
35. Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., & 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.
36. Rogan, W. J., & Gladen, B. (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology*, 107(1), 71–76.
37. Ryan, E. G., Leonard, N., O'Grady, L., More, S. J., & Doherty, M. L. (2012). Seroprevalence of *Leptospira Hardjo* in the Irish suckler cattle population. *Irish Veterinary Journal*, 65(1), 8.
38. Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G., & Boqvist, S. (2014). A cross-sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira spp.* serovars in smallholder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*, 10, 126.
39. Sanhueza, J. M., Heuer, C., Wilson, P. R., Benschop, J., & Collins-Emerson, J. M. (2017). Seroprevalence and risk factors for *Leptospira* seropositivity in beef cattle, sheep, and deer farmers in New Zealand. *Zoonoses and Public Health*, 64(5), 370–380.
40. Santa Rosa, C. A., Sulzer, C. R., De Castro, A. F. P., Yanaguita, R. M., & Giorgi, W. (1980). Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. *The International Journal of Zoonoses*, 7, 158–163.
41. Schelotto, F., Hernández, E., González, S., Del Monte, A., Ifran, S., Flores, K., Pardo, L., Parada, D., Filippini, M., Balseiro, V., Geymonat, J. P., & Varela, G.

- (2012). A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: An unresolved health problem. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(2), 69–75.
42. Silva, E. F., Cerqueira, G. M., Seyffert, N., Seixas, F. K., Hartwig, D. D., Athanzio, D. A., Pinto, L. S., Queiroz, A., Ko, A. I., Brod, C. S., & Dellagostin, O. A. (2009). *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 621–623.
43. Smythe, L. D., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Slack, A. T., Apiwatanaporn, A., Chueasuwanchai, S., Day, N. P., & 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.
44. Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2023). A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 17.
45. Strother, H. L. (1974). Host animal efficacy studies using a multivalent leptospira bacterin. *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 78, 131–135.
46. Suepaul, S. M., Carrington, C. V., Campbell, M., Borde, G., & Adesiyun, A. A. (2011). Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), 367–375.
47. Thiermann, A. B. (1984). Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. *Modern Veterinary Practice*, 65, 758–759.
48. Vasconcellos, S. A., Oliveira, J. C. F., Moraes, Z. M., Baruselli, P. S., Amaral, R., Pinheiro, S. R., Ferreira, F., Ferreira Neto, J. S., Schouberg, A., & Hartskeerl, R. A. (2001). Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 298–300.
49. Vieira, A. S., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2018). A systematic review of leptospirosis in wild animals in Latin America. *Tropical Animal Health and Production*, 50(2), 229–238.
50. Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M.,

Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Ríos, C., & Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium. (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).

}

Capítulo 3 Caracterizar el manejo reproductivo, sanitario en establecimientos lecheros del Uruguay

Introducción

La industria láctea uruguaya es uno de los sectores más importantes del país, participando en el valor de exportaciones de la economía nacional con U\$ 650 millones (INALE, 2019). Uruguay es el tercer exportador mundial de leche en polvo entera, vendiendo al exterior el 70 % de lo producido a nivel local. Los establecimientos lecheros se distribuyen en su mayoría en la cuenca sur y litoral oeste del país. En la actualidad existe una tendencia general a la reducción en el número de predios y un aumento de predios con mayor superficie y/o vacas en ordeño, por lo que la producción de leche tiende a concentrarse (OPYPA, 2019). Las exigencias del mercado internacional requieren una permanente mejora del sector para el mantenimiento de la competitividad. Los problemas reproductivos y sanitarios representan una de las limitantes de mayor impacto en los rodeos lecheros. Las alteraciones en los índices reproductivos pueden deberse a una amplia diversidad de causas, las cuales exigen un correcto diagnóstico para poder realizar una buena evaluación de la performance reproductiva del sector.

Internacionalmente existen ejemplos exitosos en el desarrollo de sistemas de monitoreo en salud animal. Un buen ejemplo es el “National Animal Health Monitoring System” (NAHMS) del “United State Department of Agriculture” (USDA) el cual aporta información de buena calidad que representa la población objetivo. Comparable con el NAHMS, también se puede citar el “National Dairy Study” de Canadá (NDS) (Bauman y col., 2016). Basado en una gran encuesta, el NDS generó datos sobre la demografía del rebaño, la bioseguridad, el cuidado y el bienestar de los animales, la salud de los terneros, el manejo reproductivo, y calidad de la leche (Renaud y col., 2017). Estos autores evidenciaron que un adecuado empleo de los indicadores antes mencionados hace posible la toma de decisiones para un correcto manejo reproductivo basados en la búsqueda de metas concretas y posibles (Bauman y col., 2016; Belage y col., 2017).

Actualmente en Uruguay los antecedentes de encuestas en el rubro lechero son proporcionados por la Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) y el Instituto Nacional de Leche (INALE). INALE (2014) realizó una encuesta en una muestra representativa de 340 explotaciones dedicadas a la producción de leche con destino

comercial. La muestra correspondió a explotaciones de los departamentos de Canelones, Colonia, Flores, Florida, Paysandú, Río Negro, San José, y Soriano, dividiendo la muestra en 5 estratos según un criterio de producción anual de litros de leche. Además, existe a nivel nacional antecedentes de aportes de encuestas realizados por profesionales del sector técnico académico. Algunos de estos estudios, seguramente por razones económicas o por objetivos concretos, carecen de un diseño de muestreo tal que los resultados puedan ser extrapolados a toda la población con un nivel de confianza predecible. El objetivo de este estudio fue caracterizar, a través de un muestreo estadísticamente representativo, las prácticas de manejo, reproductivo y sanitario en los establecimientos lecheros del Uruguay.

Materiales y Métodos

Diseño de muestreo

Se realizó un estudio transversal de los establecimientos lecheros del Uruguay. Se creó una encuesta la cual fue realizada del 1 de agosto al 31 de diciembre de 2015. Fueron seleccionados 107 predios lecheros a partir de un muestreo aleatorio estratificado distribuidos en todo el territorio uruguayo. Para el diseño de muestreo se utilizó como marco de muestreo la declaración jurada de la División de Contralor de Semovientes (DICOSE) de 2014, conteniendo todos los bovinos declarados con identificación individual. Se incluyeron 695.811 bovinos lecheros, pertenecientes a 3.042 tambos (DIEA y MGAP, 2014). Se definieron como unidades primarias de muestreo los predios lecheros los cuales fueron distribuidos en tres estratos según el tamaño de la población bovina (Tabla 1); dentro de cada estrato se seleccionó un número similar de predios, independientemente de la cantidad de predios que hubiera por estrato.

Tabla 1. Distribución de bovinos, vacas adultas y predios lecheros del Uruguay según estrato de población bovina (año 2015).

Estrato ^a	Bovinos	Vacas	Predios	n (muestra)^b
1-50 bovinos	19.438	13.491	626	35
51-250 bovinos	206.447	143.548	1.670	36
>250 bovinos	469.926	317.170	746	36
Total	695.811	474.209	3.042	107

^a Los estratos se determinaron según la población de bovinos en cada predio.

^b Cantidad de predios seleccionados para muestrear por estratos.

La encuesta fue diseñada por un equipo multidisciplinario perteneciente a la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG) y Facultad de Veterinaria. El grupo asesor modificó, refinó y validó previamente el cuestionario previo a su ejecución. En los establecimientos lecheros los veterinarios oficiales de Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) fueron los responsables de realizar la encuesta a los productores o personal autorizado al momento de la visita al establecimiento. Se utilizaron tabletas electrónicas para recabar la información y la misma se almacenó en planillas usando el software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA). La encuesta consistió en 3 preguntas abiertas y 30 preguntas cerradas. Las preguntas se enfocaron en características generales del predio, estrategias y características sanitarias, y estrategias y características reproductivas (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de encuesta realizadas a productores lecheros del Uruguay durante el segundo semestre del año 2015.

Sección	Preguntas
<i>Características generales del predio</i>	Tipo de entrevistado, presencia de asesoramiento veterinario, tipo de asesoramiento veterinario (eventual o permanente).
<i>Estrategias reproductivas</i>	Inseminación artificial: a celo visto, tiempo fijo, repaso con toros. Servicio continuo. Uso de tecnologías: manejo por CC, diagnóstico de gestación, DEP, edad de entore a los dos años, ecografía (diagnóstico de gestación, actividad ovárica).
<i>Características reproductivas</i>	Número de hembras servidas en el último año, porcentaje de preñez.
<i>Estrategias sanitarias</i>	Revisión de toros: condición física, sanitaria, capacidad de servicio, evaluación de calidad seminal. Uso de toros: compartidos, compra en remate, de descarte, vacunados, jóvenes, porcentaje de mayores de cuatro años.

Causa de refugo de hembras: sanitaria, dentición, primera falla o segunda falla reproductiva.

Vacunación contra enfermedades reproductivas

*Características
sanitarias*

Número de abortos vistos el año anterior , causa presumible de aborto, variación del porcentaje de aborto con respecto al año anterior, nacimiento de terneros débiles o muertos, existencia de repetición de celos o ciclos largos, antecedentes de enfermedades reproductivas.

DEP= Diferencia esperada de progenie. CC= Condición corporal

Análisis estadístico

Los datos se exportaron desde Microsoft Excel al software estadístico STATA/IC 15 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC) para su depuración, validación y análisis. El análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta el diseño del muestreo, a través de las rutinas para muestreos complejos del software estadístico STATA/IC 15. Se generaron distribuciones y estadísticas descriptivas para cada una de las variables de la encuesta. Así mismo la probabilidad de selección de los predios fue considerada para ponderar los análisis y proyectar las estimaciones a la población general. Las asociaciones simples se probaron usando pruebas de Chi-cuadrado de Pearson ajustado por el diseño del muestreo con una corrección de segundo orden (Rao y Scott, 1984) con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se estimó la media y error estándar de forma general y para cada estrato en cada una de las variables.

Resultados

Muestreo y características de los encuestados

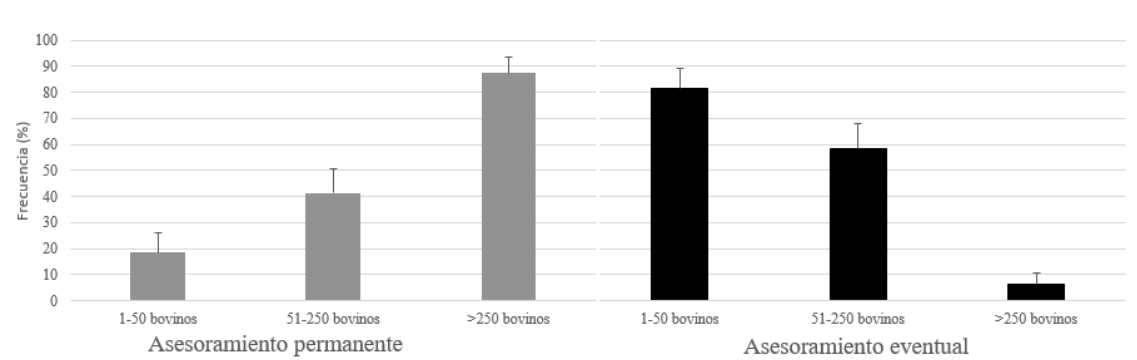
Se analizaron las encuestas de 102 predios lecheros, lo que representó una tasa de respuesta del 95,3%. El $65,1 \pm 5,4\%$ de los entrevistados que realizaron la encuesta eran propietarios del predio, seguidos por familiares ($19,0 \pm 4,6\%$), encargados o veterinarios

(10,1 $\pm$ 3,3%), capataces (2,8 $\pm$ 1,4%) y otros (3,0 $\pm$ 1,9%). No detectándose diferencias significativas entre los estratos de población bovina.

Características generales de los predios

De los predios encuestados, el 95,6 $\pm$ 1,8% tenía asesoramiento veterinario, de los cuales el 49,2 $\pm$ 5,5% era de tipo permanente mientras que el 49,1 $\pm$ 5,4% era eventual. Existió una asociación positiva entre el tipo de asesoramiento y el tamaño del predio ($p < 0,01$). Los predios de menor tamaño suelen contar con asesoramiento veterinario del tipo eventual, mientras que los veterinarios permanentes fueron más frecuentes en predios de mayor tamaño (Figura 1).

Figura 1. Porcentaje de predios lecheros que cuentan con asesoramiento veterinario permanente o eventual según los diferentes estratos de población bovina ($p < 0,01$).



Estrategias reproductivas

La técnica de inseminación artificial (IA) fue utilizada por el 83,8 $\pm$ 5,2% de los productores, no existiendo diferencias significativas entre estratos. Dentro de este porcentaje, el 72,0 $\pm$ 6,2% realizaba la IA a celo visto. La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) era utilizada por el 15,9 $\pm$ 4,0% de los predios, habiendo diferencias significativas entre estratos (Tabla 3). El 36,1 $\pm$ 6,5% de los establecimientos realizaba repaso con toro luego de la IA. No hubo asociación entre la tasa de preñez y el empleo de estas técnicas.

En cuanto al empleo de otras tecnologías reproductivas el 20,2 $\pm$ 4,2% utilizaban manejo diferencial según condición corporal de las vacas. Mientras que el uso de diferencia esperada de prole (DEP) era empleado por un 13,1 $\pm$ 3,5% de los productores, utilizándose en mayor medida por los predios más grandes (Tabla 3).

Tabla 3. Utilización de estrategias reproductivas de acuerdo a los estratos de población bovina en predios lecheros del Uruguay (Media $\pm$ Error Estándar).

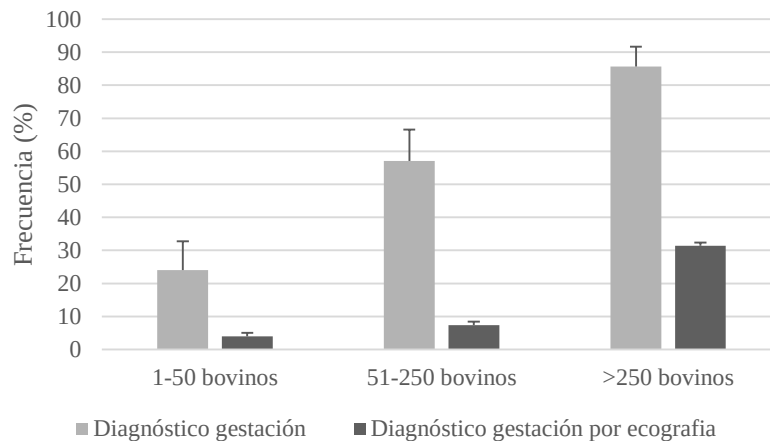
	1-50 bovinos (%)	50-250 bovinos (%)	>250 bovinos (%)	valor-p
IA	80,0 ($\pm$ 10,1)	80,0 ($\pm$ 9,2)	90,6 ($\pm$ 5,2)	0,50
Celo visto	73,3 ($\pm$ 11,8)	65,9 ($\pm$ 10,9)	81,3 ($\pm$ 7,0)	0,38
IATF	0	5,0 ($\pm$ 5,0)	37,5 ($\pm$ 8,7)	<0,01
Repaso toros	13,3 ($\pm$ 9,1)	35,0 ($\pm$ 10,9)	46,9 ($\pm$ 9,0)	0,18
Manejo por CC	20,0 ($\pm$ 8,2)	10,7 ($\pm$ 6,0)	37,1 ($\pm$ 8,3)	0,04
DEP	0	7,1 ($\pm$ 5,0)	32,4 ($\pm$ 8,1)	<0,01
Edad de entore a los dos años	64,0 ($\pm$ 9,8)	60,7 ($\pm$ 9,4)	65,7 ($\pm$ 8,1)	0,89
Servicio continuo	73,6 ($\pm$ 10,3)	76,0 ($\pm$ 8,7)	36,6 ($\pm$ 10,5)	0,01

IA = Inseminación artificial. IATF=Inseminación artificial a tiempo fijo. CC=Condición corporal. DEP= Diferencia esperada de progenie

Características reproductivas

En la Figura 2 se observa la asociación entre la utilización del diagnóstico de gestación y el tamaño de los predios lecheros ($p < 0,01$). De acuerdo a las respuestas de los encuestados, un $59,9 \pm 5,5\%$ de los predios realizaba diagnóstico de gestación. Solo el $13,7 \pm 3,6\%$ de los que contestaron realizar diagnóstico de gestación realizaban ecografía, siendo claramente mayor el uso de esta tecnología para el caso de los predios con más de 250 bovinos (Figura 2; $p = 0,01$). El $17,6 \pm 4,1\%$ de los productores realizaban ecografía para la evaluación de la actividad ovárica, los predios más grandes presentaron una tendencia a realizarlo en mayor proporción. No se encontró asociación de esta medida con la tasa de preñez. Por otro lado, el $62,8 \pm 5,8\%$ de los productores entoraban las vaquillonas con 2 años, no encontrándose diferencias entre estratos (Tabla 3).

Figura 2. Porcentaje de predios lecheros que realizan diagnóstico de gestación ($p<0,01$) y utilización de ecografía ($p=0,01$) para dicho diagnóstico según los diferentes estratos de población bovina.



El porcentaje de preñez en aquellos predios que realizan diagnóstico de gestación se estimó en $79,7 \pm 2,0\%$, no encontrándose asociación entre estratos, ni con el asesoramiento profesional en el predio.

El $66,35 \pm 5,9 \%$ de los tambos realizaban el servicio de forma continua durante el año, encontrándose diferencias significativas entre estratos (Tabla 3; $p=0,01$). El total de vacas y vaquillonas servidas el último año se detalla en la Tabla 4, y como era de esperarse a medida que el tamaño del predio aumenta también lo hace la cantidad de hembras servidas.

Tabla 4. Promedio de vacas y vaquillonas servidas en el año 2014 en predios lecheros del Uruguay según estrato de población bovina.

Estratos	Media	Error estándar
1-50 bovinos	29,7	4,7
51-250 bovinos	63,7	5,8
>250 bovinos	284,3	32,4
Promedio general	111,9	8,8

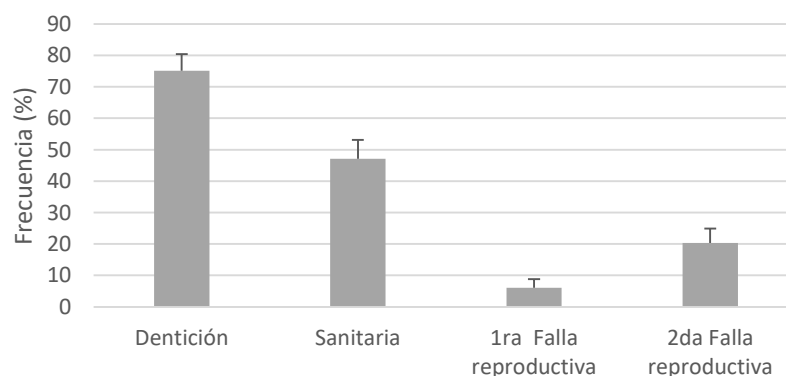
Estrategias sanitarias

La evaluación de los toros previo al servicio se realizaba en el $49,0 \pm 7,6\%$ de los predios, siendo la condición física ($44,2 \pm 7,6\%$) y sanitaria ($39,7 \pm 7,1\%$) de los toros la más frecuentemente evaluada. Por otro lado, la capacidad de servicio era realizada sólo por el $10,0 \pm 4,7\%$ de los tambos; y la evaluación de la calidad seminal por el $11,1 \pm 4,3\%$. No se encontraron diferencias significativas entre estratos.

De acuerdo al origen de los toros utilizados durante la época de servicio, se reportó que el $8,7 \pm 3,3\%$ utilizaba toros compartidos, mientras que el $21,3 \pm 5,1\%$ de los predios los adquirían en remates o ferias. En los establecimientos existía un $11,9 \pm 3,8\%$ de toros mayores a 4 años, no hubo diferencias significativas entre estratos. Los toros de descarte eran utilizados por el $1,5 \pm 1,1\%$ de los tambos, habiendo diferencias entre estratos ($p < 0,01$), los únicos que los utilizaban eran los tambos que pertenecían al estrato de 1-50 bovinos siendo el porcentaje de $8,3 \pm 5,8\%$. El porcentaje de encuestados que reportó utilizar toros jóvenes en sus rodeos era del $52,7 \pm 6,1\%$, mientras que la vacunación de toros previo al servicio era empleada por el $46,5 \pm 6,0\%$.

La distribución de causas de refugo en la población de vacas se muestra en la Figura 3, siendo la principal causa por dentición. Únicamente en los refugos por problemas sanitarios se reportaron diferencias significativas entre estratos. Los estratos con 1-50 bovinos refugan por esta causa en menor medida ($21,4 \pm 7,9\%$) que aquellos estratos con >250 bovinos ($58,6 \pm 9,3\%$) ($p = 0,04$).

Figura 3. Causas de refugo de la población de vacas de cría en predios lecheros del Uruguay.



La utilización de vacunas como medida preventiva para enfermedades reproductivas según los encuestados era utilizada por el $56,6 \pm 5,4\%$ de los productores lecheros. Esta variable se asoció con el tamaño del predio ($p=0,03$) y con el tipo de asesoramiento veterinario ($p<0,01$), pero no con la presencia de antecedentes de enfermedades reproductivas (AER). Las vacunas eran más utilizadas por los estratos de >250 bovinos ($93,8 \pm 4,3\%$) y en menor medida por los estratos de $1-50$ bovinos ($36,7 \pm 4,3\%$). Como era esperable, esta herramienta era más utilizada en los predios que cuentan con un asesoramiento veterinario de forma permanente ($78,2 \pm 7,2\%$) que cuando era de tipo eventual ($34,9 \pm 8,4\%$). Por otro lado, sólo el $22,8 \pm 4,8\%$ contestó vacunar contra todas las enfermedades reproductivas (Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina (DVB), Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y Campylobacteriosis), sin encontrarse asociación con el tamaño del predio ni con el tipo de asesoramiento veterinario. Dentro de las vacunas utilizadas se reportó que el $40,0 \pm 5,7\%$ de los predios vacunaban contra Brucelosis, el $49,0 \pm 5,4\%$ contra Leptospirosis, el $32,1 \pm 5,4\%$ contra DVB, el $38,3 \pm 5,4\%$ contra IBR y el $26,8 \pm 4,9\%$ contra Campylobacteriosis. Se encontró una asociación positiva entre la vacunación contra Leptospirosis ($p<0,01$) e IBR ($p=0,02$) y el estrato de población bovina. La vacunación para IBR se utilizaba más en los estratos con >250 bovinos ($62,5 \pm 8,7\%$) que en los dos estratos con <250 bovinos ($30,0 \pm 8,5\%$). De la misma manera para Leptospirosis, la vacuna era más utilizada por los productores más grandes ($87,5 \pm 5,9\%$) que por los medianos y pequeños productores ($33,3 \pm 8,9\%$ y $36,7 \pm 8,8$, respectivamente).

Características sanitarias

Para evaluar los antecedentes de enfermedades reproductivas (AER) se tuvieron en cuenta las siguientes enfermedades: Brucelosis, Leptospirosis, Neosporosis, IBR, DVB, Campylobacteriosis y Trichomoniasis. El $58,7 \pm 6,7\%$ de los encuestados declaró no tener ningún AER en el predio. Dentro de los predios con AER ($41,3\%$) se encontraron diferencias significativas entre estratos de población bovina ($p<0,01$). Los encuestados del estrato con $51-250$ bovinos reportaron tener menos AER ($22,2 \pm 10,1\%$) que el de >250 bovinos ($78,9 \pm 9,6\%$). La distribución de cada una de las enfermedades reproductivas se representa en la Tabla 5. Para el caso de Leptospirosis, IBR y Brucelosis se encontraron diferencias significativas con los estratos de población bovina (Tabla 5).

Tabla 5. Antecedentes de enfermedades reproductivas según encuesta realizada a productores en predios lecheros del Uruguay (Media $\pm$ Error estándar).

	Total (%)	1-50 (%)	51-250 (%)	>250 (%)	Valor-p
Leptospirosis	31,2 ($\pm$ 6,2)	23,1 ($\pm$ 12,2)	16,7 ($\pm$ 9,0)	65,0 ($\pm$ 10,9)	< 0,01
Neosporosis	16,5 ($\pm$ 4,8)	23,1 ($\pm$ 12,2)	5,6 ($\pm$ 5,6)	35,0 ($\pm$ 10,9)	0,07
Trichomoniasis	4,5 ($\pm$ 4,3)	0	5,6 ($\pm$ 5,6)	5,0 ($\pm$ 5,0)	0,78
IBR	4,2 ($\pm$ 2,3)	0	0	15,0 ($\pm$ 8,2)	< 0,01
Campylobacteriosis	4,0 ($\pm$ 2,3)	7,7 ($\pm$ 7,7)	0	10,0 ($\pm$ 6,9)	0,13
Brucelosis	1,2 ($\pm$ 1,2)	7,7 ($\pm$ 7,7)	0	0	0,03
DVB	0	-	-	-	-

Un 90,9 $\pm$ 4,2% de los productores lecheros declararon observar abortos el año anterior, no habiendo diferencias significativas entre estratos. Dentro de estos se reportó que la media de abortos vistos anualmente fue de 4,4 $\pm$ 0,6, siendo mayor este número en el estrato >250 bovinos que en los dos estratos restantes (1,2 $\pm$ 0,4 vs. 9,0 $\pm$ 1,7) (p <0,01), solo el 16,7 $\pm$ 4,9% observaron un aumento de estos con respecto a años anteriores. Hubo una asociación positiva entre el número de abortos observados y la presencia de AER, en predios sin antecedentes el número de abortos fue de 2,2 $\pm$ 0,4 abortos, mientras que los que tienen antecedentes fue de 8,3 $\pm$ 1,9.

En la Tabla 6 se representan las causas presumibles de abortos, el nacimiento de animales débiles o muertos, la observación de ciclos largos y la repetición de celo en las vacas en estación reproductiva. Se observa que en la mayoría de los predios los encuestados desconocían la causa de aborto, no habiendo diferencias significativas entre estratos. Se estimó que el nacimiento de animales débiles o muertos era mayor en estratos de mayor tamaño (>250 bovinos) que en aquellos con 1-50 bovinos (p <0,01) (57,1 $\pm$ 8,5% vs 16,7 $\pm$ 6,9%). Para las variables restantes no hubo asociación estadística con el tamaño del predio. Tampoco hubo asociación entre la presencia de repetición de celos u observación de ciclos largos con AER.

Tabla 6. Características sanitarias de predios lecheros del Uruguay.

Eventos Sanitarios	Media (%)	Error estándar (%)
Aborto, por causas:		
Desconocidas	57,4	6,7
Nutricionales	10,0	4,2
Venéreas	1,0	1,0
Leptospirosis	9,4	3,4
Brucelosis	4,3	2,7
Otras causas	12,0	4,4
Nacimiento de animales débiles	33,6	5,2
Repetición de celos	56,5	5,6
Ciclos más largos	26,3	5,2

Discusión

La tasa de respuesta de la encuesta fue alta, este parámetro puede estar influenciado por la estrategia de recolección de datos. En este estudio la encuesta fue de tipo presencial, donde los encargados de realizarla fueron veterinarios. Existen trabajos que reportan tasas de respuesta menores, donde las estrategias fueron otras, vía email, online o por teléfono, este aspecto debe ser tomado en cuenta en el análisis de los datos y en la evaluación de sesgos (Denis-Robichaud y col., 2016; Klein-Jöbstl y col., 2015; Van Schyndel y col., 2019). Para controlar los sesgos de selección, se categorizaron los predios en tres estratos, cada estrato fue calculado y representado por un número de establecimientos adecuado para la proyección posterior de los resultados a la población general.

El tipo de asesoramiento veterinario estuvo fuertemente vinculado al tamaño de los predios. El porcentaje de predios con asesoramiento veterinario permanente aumentaba cuando aumentaba el tamaño poblacional del estrato, interpretando este resultado como una característica asociada a los aspectos demográficos y económicos de los predios de mayor tamaño. Sin embargo, los datos no permitieron evidenciar una diferencia en las tasas de preñez respecto al tipo de asistencia veterinaria. Astaíza y col, (2017) también evaluaron esta característica, y si bien reportaron niveles de asistencia

veterinaria menores, concluyeron que la asistencia técnica es considerada como uno de los procesos clave para orientar el desarrollo productivo y tecnológico del sector agropecuario.

Cuando se preguntó por la utilización de diferentes estrategias reproductivas, la técnica de IA fue un procedimiento ampliamente utilizado en predios lecheros uruguayos ($83,8 \pm 5,2\%$). Si comparamos estos datos con los resultados aportados por la encuesta de INALE (2014), la discrepancia más marcada se ubica en los predios de menor tamaño poblacional o los tambos con menor producción anual de leche, donde INALE reporta tasas de IA menores (28 a 48%). Es importante recalcar que los estratos de ambas encuestas tuvieron una construcción distinta, este hecho pudo impactar en las diferencias observadas entre ambos estudios. En nuestro trabajo, aunque no hubo diferencias significativas entre estratos, existe una tendencia a que los predios con mayor tamaño poblacional inseminen más respecto a los de menor tamaño y ambas encuestas acuerdan en este punto. En el año 2001 y 2003 otras encuestas realizadas en predios lecheros uruguayos arrojaron datos sobre uso de IA de 67,9 % y 65% respectivamente (Ibarra y col., 2002; Zaffaroni y col., 2003). A nivel internacional la utilización de IA se estimó entre el 81,1 y el 89,3% (Caraviello y col., 2006; NAHMS, 2014; Van Schyndel y col., 2019). Si se comparan los datos actuales con los antecedentes nacionales publicados ya hace más de una década, se observa una evolución positiva en la incorporación de esta tecnología, observándose con mayor énfasis en los predios más grandes y acercándose a porcentajes internacionales como los ya previamente citados.

Dentro de las estrategias de IA a celo visto fue la más utilizada y distribuida homogéneamente entre los tres estratos. Si se compara este resultado con los datos de la encuesta de “National Dairy Study” de Canadá, se observa que la IA a celo visto fue más utilizada en los establecimientos chicos (<39 vacas) y medianos (39 y 85 vacas) respecto a los grandes (>85 vacas). Los autores atribuyen esta diferencia al tiempo insumido de trabajo que requiere esta estrategia, siendo demasiado en tamaños poblacionales grandes lo que hace necesario la incorporación de tecnologías más avanzadas (Van Schyndel y col., 2019). De hecho, en este trabajo la IATF fue utilizada en mayor medida por los predios más grandes (15,9%), pudiendo estar relacionado no solo al tiempo insumido, sino también a los costos que implica la incorporación de este tipo de tecnología. En la presente encuesta, los predios que utilizan los programas de IATF tienen una diferencia

de más de 10% si se los compara con datos de EEUU, donde reportan la utilización de este programa en un 28,0% de los predios lecheros (NAHMS, 2014).

Los datos que derivaron de la encuesta no permitieron asociar el uso de tecnologías reproductivas con la mejora en las tasas de preñez. Si bien este resultado concuerda con los reportados por Denis-Robichaud y col. (2016), quienes sí lo asocian a las tasas de inseminación más altas, pero no diferencias significativas en la tasa de preñez, consideramos que la ausencia de dicha asociación tampoco descarta este hecho en sí mismo. Para profundizar en este tema se debería de tener en cuenta otros datos, que no fueron consultados por esta encuesta como ser: tipos de protocolos, capacitación del personal, estado de las vacas, etc. (Cavestany, 2000, De Nava, 2011). De Nava (2009), enfatiza que un programa de IATF depende en gran medida de veterinarios especializados con una buena planificación de los protocolos.

El uso de diferencia esperada de progeñe (DEP), manejo de condición corporal en vacas, así como manejo diferencial de vaquillonas se aplica mayoritariamente en el estrato de >250 bovinos, lo que supone que estas prácticas también se asocian con el tamaño poblacional y con una mayor disponibilidad de recursos tanto técnicos como económicos por parte de estos tambos. Nuevamente el hecho de que la demografía pueda estar directamente asociadas con la implementación de ciertas prácticas de manejo reproductivo ya fue previamente reportado (Denis-Robichaud y col., 2016).

Existen varios métodos disponibles para realizar el diagnóstico de gestación en bovinos, como ser: observación visual (retorno al estro), tacto rectal y ecografía (Fricke y col., 2016; Wisnicky y col., 1948). Si bien el diagnóstico de gestación es una práctica que es habitual en los predios lecheros del Uruguay, el uso de ecografía como método diagnóstico es más frecuente en los predios grandes (>250 bovinos). Este resultado podría tener una asociación con el hecho que los predios más grandes tienen un porcentaje de asistencia técnica permanente mayor que el resto. La encuesta de INALE (2014) reportan un porcentaje de diagnóstico de gestación de 46% (remitentes y queseros), y si se tienen en cuenta solo los remitentes alcanzan un porcentaje mayor, 56%, el cual se acercaría más a nuestro reporte. INALE no discrimina entre los que realizan tacto rectal y ecografía. Por otro lado, se debe mencionar, el trabajo de Zaffaroni y col., (2003), quienes realizaron una encuesta a 53 tambos de la cuenca sur del Uruguay, reportando que el 92% de los

predios realizaban algún diagnóstico de preñez, de los cuales el 84% lo hacían por tacto rectal y el 8% por ecografía. Consideramos que las diferencias en el diagnóstico de preñez entre nuestra encuesta, la de INALE (2014) y la de Zaffaroni y col., (2003) pueden atribuirse a la diferencia de los marcos geográficos y de muestreo entre estos trabajos. Si bien en nuestra encuesta no se consultó directamente sobre el uso de tacto rectal, se podría asumir que aquellos predios que no realizan ecografía para el diagnóstico lo hacen a través del tacto (86,3%). Como era previsible teniendo en cuenta el tiempo transcurrido entre el trabajo de Zaffaroni y col., (2003) y el nuestro, se encontró un mayor uso de la ecografía como método diagnóstico (13,7% vs. 8%). Si se compara nuestros datos con los datos de encuestas realizadas en Canadá y EEUU ambas también reportan el uso de tacto rectal como principal método para el diagnóstico de gestación. La diferencia con estos dos países radica en los porcentajes de uso de ecografía, siendo menor su uso en Uruguay. De todas maneras, tanto en Uruguay como en los reportes internacionales el uso de la ecografía se ve con más frecuencia en predios grandes (NAHMS, 2014; Van Schyndel y col., 2019).

Existen antecedentes de encuestas nacionales que reportan tasas de preñez similares a la encontrada en nuestro trabajo. Lemaire y col., (2011), realizaron una encuesta en predios lecheros uruguayos, la muestra estuvo constituida por predios con asesoramiento veterinario y seguimiento reproductivo lo cual hace que los datos tengan un sesgo, a pesar de lo cual, los investigadores encontraron que el porcentaje de vacas preñadas sobre el total de vacas masa fue de 73,6%, y sobre vacas ofrecidas el 78,4%. Ibarra y col., (2002) revelaron a partir de una encuesta a productores remitentes a Cooperativa Nacional de Productores de Leche (Conaprole) una tasa de preñez promedio de 67,7% y encontraron que este indicador era más problemático a medida que los predios aumentaban en tamaño poblacional, reportando tasas de preñez en predios de menos de 50 vacas de 75%. Por otro lado, la DIEA, MGAP (2014) reporta tasas de preñez en ganado de cría en el rubro cárnico de 76,2%, si bien las poblaciones y rubro no son las mismas este dato es próximo al reportado por nuestra encuesta y los reportes nacionales previamente citados. Sin embargo, a diferencia del trabajo de Ibarra y col., (2002) en nuestro trabajo no hubo diferencias en la tasa de preñez entre estratos.

La evaluación de la capacidad física y sanitaria de los toros aparece como la estrategia más utilizada por los encuestados, esto seguramente sea debido a que son las

formas de evaluación más económicas y que requieran menor capacitación técnica. Si bien Crowe y col., (2018) reportaron las ventajas de realizar la evaluación de la capacidad de servicio y de la calidad seminal de los toros en los parámetros reproductivos, con los datos recabados en esta encuesta no se pudo detectar el impacto de estas en las tasas de preñez, pero si se pudo estimar el bajo porcentaje de establecimientos que lo realizan.

La práctica de mantener al toro durante todo el año con las vacas se da más en tambos de 1-50 bovinos, y este porcentaje disminuye a medida que aumenta el estrato de población bovina. Esta forma de manejo trae como consecuencia que las pariciones en estos predios se desarrollen de forma continua durante todo el año, sugiriendo que en tambos más grandes se busca concentrar las épocas de pariciones para llegar a tener picos de producción de leche y así intensificar sus sistemas productivos.

Las principales causas de refugo son: reproductivas (incapacidad para concebir), mastitis, y baja producción (Ansari-Lari y col., 2012; Bascom y col., 1998). En este trabajo los encuestados destacaron a la dentición como principal causa de refugo, independientemente del estrato de población bovina; la causa reproductiva no resulto la más importante. En esta encuesta no se evaluaron causas productivas como posibles causas de refugo y dentro de las sanitarias no se especificaron cuáles podrían estar involucradas.

La administración de vacunas es considerada uno de los aspectos más importantes para el control de enfermedades (Tizard, 2009). En el presente trabajo la práctica de vacunación se vio asociada al tamaño del predio y tipo de asesoramiento veterinario, pero no a los AER. La asociación del uso de vacunas reproductivas con el tamaño del predio también se vio en los resultados de la encuesta de INALE. Da Silva Silveira, (2019) realizó un relevamiento de aspectos sanitarios en 20 tambos, con un mínimo de 60 y un máximo de 750 vacas y con antecedentes de abortos, el 85 % de los establecimientos tenía antecedentes de vacunación contra alguna de las enfermedades abortivas. De los tambos que usaban vacunas, 47% utilizaban solamente contra Leptospirosis y el 35% usaban vacunas para más de un agente (DVB, IBR, Campylobacteriosis, Leptospirosis). Si bien el trabajo de da Silva Silveira, (2019) no fue un muestreo aleatorio, nuestra encuesta concuerda respecto al porcentaje de vacunación contra Leptospirosis ($49,0 \pm 5,4\%$) no siendo así el porcentaje de vacunación de otras enfermedades reproductivas. Así mismo,

hay que destacar que este hecho también concuerda con trabajos internacionales donde reportan la vacuna contra Leptospirosis como una de las más utilizadas junto con DBV e IBR (Cresswell y col., 2014). Además, Cresswell y col., (2014) destacan el rol del veterinario como el principal proveedor de vacunas y fuente principal de información sobre éstas y reflexiona que muchos de los productores que no usan vacunas es debido a que no logran detectar problemas en sus rodeos. Esto no pudo quedar demostrado en nuestro estudio ya que los antecedentes de vacunación no se asociaron con los AER, aunque hay que mencionar que los datos sobre AER podrían contener un sesgo ya que la encuesta no incluía la confirmación por diagnóstico de laboratorio para establecer con mayor certeza estos antecedentes.

Estudios nacionales estimaron la seroprevalencia de diferentes enfermedades infecciosas que afectan la reproducción como ser: Leptospirosis, Neosporosis, Campylobacteriosis, Brucelosis, IBR y DBV (da Silva Silveira, 2019; Macchi y col., 2020; de Freitas y col., 2005; Repiso y col., 2005). Debido a estos antecedentes dichas enfermedades fueron consultadas en esta encuesta. La Leptospirosis fue una de las enfermedades que más se reportó sobre todo en predios grandes, lo cual tiene correspondencia con la mayor vacunación en este estrato (>250 bovinos).

La media de abortos reportada por esta encuesta está dentro de los porcentajes reportados por otros autores (Hovingh y col., 2009; Norman y col, 2012) y su asociación con la presencia de AER. Este resultado coincide con un estudio nacional realizado por Macías-Rioseco, (2019), quien reportó a partir de un estudio de serie de 102 casos de abortos que el 50% de los casos estudiados respondían a una causa infecciosa.

Conclusión

Con el objetivo de generar información sobre las características reproductivas y el manejo sanitario empleado en la cuenca lechera del Uruguay se realizó esta encuesta, la misma tiene la fortaleza de partir de datos con un diseño estadístico representativo de la población de establecimientos lecheros. Al igual que en otros países el análisis de esta encuesta pudo revelar que el aspecto demográfico cumple un rol significativo en la elección de los aspectos reproductivas, sanitarios y de manejo, donde los predios de más de 250 bovinos presentan características distintivas respecto a predios con tamaños menores. Sin embargo, a partir de estos datos no se pudo demostrar que las diferencias en

las características reproductivas y/o sanitarias tuvieran un impacto en las tasas de preñez. El análisis de los datos permitió una aproximación a la situación nacional, la cual puede ser interpretada por productores y técnicos para caracterizar el sector y revelar aspectos en los cuales intervenir para mejorar los indicadores reproductivos y sanitarios. A su vez, se establecen antecedentes para futuras investigaciones que estudien la influencia de diferentes parámetros en los resultados productivos y económicos en los predios lecheros del Uruguay.

Bibliografía

1. Ansari-Lari, M., Mohebbi-Fani, M., & Rowshan-Ghasrodashti, A. (2012). Causes of culling in dairy cows and its relation to age at culling and interval from calving in Shiraz, Southern Iran. *Vet Res Forum*, 3(4), 233-237.
2. Astaíza, J.M., Muñoz, M.R., Benavides, C.J., Vallejo, D.A., & Chaves, C.A. (2017). Caracterización técnica y productiva de los sistemas de producción lechera del valle de Sibundoy, Putumayo (Colombia). *Rev. Med. Vet*, 34, 31-43.
3. Bascom, S.S., Young, A.J. (1998). A summary of the reasons why farmers cull cows. *J Dairy Sci*, 81(8), 2299-2305.
4. Bauman, C. A., Barkema, H. W., Dubuc, J., Keefe, G. P., & Kelton, D. F. (2016). Identifying management and disease priorities of Canadian dairy industry stakeholders. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10194–10203.
5. Belage, E., Dufour, S., Bauman, C., Jones-Bitton, A., & Kelton, D. F. (2017). The Canadian National Dairy Study 2015-Adoption of milking practices in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3839–3849.
6. Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Fricke, P.M, Wiltbank, M.C., Florent, M.J., Cook, N.B., Nordlund, K.V., Zwald, N.R., & Rawson, C.L. (2006). Survey of Management Practices on Reproductive Performance of Dairy Cattle on Large US Commercial Farms. *Dairy Sci*, 89, 4723–4735.
7. Cavestany, D. (2000). Resumen de ensayos sobre eficiencia reproductiva en vacas de leche en producción, factores que la afectan y alternativas de manejo para incrementarla (Período 1992 a 1997). En *Temas de lechería: reproducción*. (pp.1-18). Montevideo: Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA.
8. Cresswell, E., Brennan, M.L., Barkema, H.W., & Wapenaar, W. (2014). A questionnaire-based survey on the uptake and use of cattle vaccines in the UK. *Vet Rec Open*, 1(1), 1-10.

9. Crowe, M.A., Hostens, M., & Opsomer, G. (2018). Reproductive management in dairy cows the future. *Irish Veterinary Journal*, 71(1), 2-13.
10. da Silva Silveira, C. (2019). Enfermedades infecciosas que causan abortos en bovinos con enfoque en rodeos lecheros del Uruguay. (Tesis de Doctorado en Salud Animal). Udelar, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
Recuperadode:<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/24123/1/silvaS.pdf>
11. de Freitas, J., Gil, A., Piaggio, J., Nuñez, A., Suanes, A., Zaffaroni, R., Invernizzi, I, & Cernicchiaro, N. (2005). Seroprevalence evolution of infectious bovine rinotraqueitis (IBR) and bovine diarrhea (BVD) in dairy cattle population of the southern region of Uruguay. En 12º Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD). (pp 124). Montevideo, Uruguay
12. de Nava, G. (2009). El rol del veterinario en la instrumentación de programas de IATF. En XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatria. (pp. 126-137). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
13. de Nava, G. (2011). Un manejo reproductivo controlado en tambos de Uruguay. En XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatria. (pp. 1-23). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
14. Denis-Robichaud, R. L. A., Cerri, A., Jones-Bitton, S.J., & LeBlanc, J. (2016). Survey of reproduction management on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci*, 99(11), 9339-9351.
15. DIEA (2014). Anuario estadístico Agropecuario. Recuperado en [:http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014](http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014)
16. Fricke, P.M., Ricci, A., Giordano, J.O., & Carvalho, P.D. (2016). Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, 32, 165–80.
17. Hovingh, E. (2009). Abortions in dairy cattle: I. Common causes of abortions. *Virginia Coop. Ext. Publ.* 404-288.
18. Ibarra, D. (2002). Indicadores reproductivos en la cuenca lechera de Conaprole en los servicios de otoño de 2001. En XXX Jornadas Uruguayas de Buiatria. (pp. 256-258). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

19. INALE (2014). Encuesta Lechera INALE 2014: resultados preliminares. Recuperado de: <https://www.inale.org/historico/wp-content/uploads/2018/08/Encuesta-lechera-2014.pdf>
20. INALE (2019). Situación y perspectiva de la lechería uruguaya. *Informes INALE*, 18. Recuperado en: <https://www.inale.org/informes/informe-2019/>
21. Klein-Jöbstl, D., Arnholdt, T., Sturmlechner, F., Iwersen, M., & Drillich, M. (2015). Results of an online questionnaire to survey calf management practices on dairy cattle breeding farms in Austria and to estimate differences in disease incidences depending on farm structure and management practices. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57(1), 44-53.
22. Lemaire, C., Grela, C., De María, P., & Cavestany, D. (2011). Indicadores reproductivos en predios lecheros en Uruguay: Resultados de dos años de evaluación. *Veterinaria (Montevideo)*, 48 (184), 17-22.
23. Macchi, M. V., Suanes, A., Salaberry, X., Fernández, F., Piaggio, J., & Gil, A.D. (2020). Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 179, 1-6.
24. Macías-Rioseco, M. (2019). Causas de aborto en bovinos lecheros de Uruguay. (Tesis de Doctorado en Salud Animal). Udelar, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
25. National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Dairy 2014. (2018). Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations. United States Department of Agriculture, USA. Recuperado en: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy14/Dairy14_dr_PartIII.pdf
26. Norman, H.D., Miller, R.H., Wright, J.R., Hutchison, J.L., & Olson, K.M. (2012). Factors associated with frequency of abortions recorded through Dairy Herd Improvement test plans. *J Dairy Sci*, 95(7), 4074-4084.
27. OPYPA (2019). Oficina de Programación y Política Agropecuaria. Recuperado en: <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuario%202019/ORIGINAL%202019%20OPYPA%20INTERACTIVO%20agregado%2018-12-2019.pdf>
28. Rao, J.N.K., & Scott, A.J., (1984). On chi-squared tests for multiway contingency tables with cell proportions estimated from survey data. *Annals of Statistics*, 12, 46-60.

29. Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., & 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.
30. Tizard, I. R. (2009). *Veterinary immunology: an introduction*. (8th ed). Texas: Saunders
31. Van Schyndel, S.J., Bauman, C.A, Bogado, O., Renaud, D. L., Dubuc, J., & Kelton, D.F. (2019). Reproductive management practices on dairy farms: The Canadian National Dairy Study 2015. *J. Dairy Sc.*, 102(2), 1822-1831.
32. Wisnicky, & W., Cassida, L.E. (1948). A manual method for diagnosis of pregnancy in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 113-451.
33. Zaffaroni, R.; Cernicchiaro, N., de Freitas, J., Piaggio, J., Suanes, A., Huertas, S., & Gil, A. (2003). Encuesta sobre características reproductivas y de manejo en establecimientos lecheros del Uruguay. EN XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatria. (pp. 129). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Capítulo 4 Identificar potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de Leptospirosis a nivel de rebaño

Introducción

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira* spp. (Picardeau y col., 2017). Esta enfermedad presenta una epidemiología compleja y dinámica que incluye la relación entre humanos, animales y ecosistemas. Después de una fase leptospiremia, las *Leptospira* spp. colonizan y persisten principalmente en el riñón de los animales portadores y se excretan en la orina durante varios meses, por animales portadores. La infección por *Leptospira* spp. se produce a través de abrasiones cutáneas o membranas mucosas (Bharti y col., 2003). La transmisión del género *Leptospira* spp. ocurre a través del contacto directo con la orina de un animal infectado, o indirectamente, a través del contacto con el medio ambiente contaminado (Levett y col, 2001). Con una humedad y temperaturas cálidas, estos microorganismos pueden persistir en el medio ambiente durante varios meses (Levett y col, 2001). Algunos autores han demostrado que más del 20% de los animales seropositivos continúan excretando bacterias a través de la orina (Dorjee y col., 2008, Zarantonelli y col, 2018).

La convivencia de múltiples especies animales da como resultado un mayor contacto y probabilidad de infección entre animales infectados y susceptibles generando la oportunidad para que el microorganismo se propague a nuevos huéspedes en lugar de establecerse en un solo reservorio animal (Marano y col, 2006). Los roedores son atraídos a los mismos ecosistemas que habitan animales domésticos, así como a la alimentación de mismos (Jansen y col, 2005). Esta convivencia en las zonas rurales facilita el contacto directo entre animales silvestres y ganado.

Una vez que la *Leptospira* se excreta al medio ambiente a partir de la orina de los animales infectados, el patógeno puede sobrevivir semanas o meses en el suelo y agua dulce (Levett, 2001). Este fenómeno se da sobre todo en climas tropicales donde las inundaciones contribuyen a la persistencia del microorganismo en el ambiente (Adler, 2015).

Los últimos antecedentes nacionales fueron reportados por Gil y col, (2001), los investigadores realizaron un monitoreo de salud animal en la cuenca sur de Uruguay, reportando una seroprevalencia de 14 % en bovinos de leche y de 61,5 % a nivel predial. Posteriormente un nuevo muestreo del año 2003 reporta seroprevalencias individuales de 22,63 % y 60,60 % a nivel predial (Gil A, comunicación personal 2003). Repiso y col. (2005), informan prevalencias en ganado de carne de 38,5 % a nivel individual y de 71,2% a nivel predial, predominando los serovares Hardjo y Wolffi. Easton (2006), en un estudio sobre las principales causas infecciosas de abortos en bovinos, demuestran que en 99 de 431 fetos estudiados se detectaron anticuerpos contra diferentes serovares de *Leptospira spp.* en líquido fetal, en suero materno o en ambos.

Existe en la bibliografía diferentes estudios científicos que han tratado de vincular diferentes factores asociados a la explotación ganadera con la presencia de la enfermedad. Lilenbaum y col (2003) realizaron un estudio de factores de riesgo en Brasil y encontraron que los rebaños con control veterinario permanente o visitados por lo menos cada 2 semanas registraron tasas de seroreactividad de 54,1 y 56,1%, respectivamente. Por otro lado, los rebaños visitados con menor frecuencia y los que no tienen ninguna asistencia veterinaria mostraron tasas seroreactividad mucho mayor de 91,3% y 97,4%, respectivamente. Otro factor de riesgo fue el co-pastoreo con otras especies, principalmente los cerdos, encontrando que las infecciones fueron en su mayoría por los serovares: Pomona y Bratislava. Otro estudio en Irlanda, España y USA coinciden en que los factores de riesgo para la Leptospirosis a nivel de establecimiento asociados a la serovar Hardjo en rebaños lecheros incluyen: mayor tamaño poblacional, co-pastoreo con ganado bovino infectado u ovinos, el acceso del ganado a la contaminación de cursos de agua, uso de toro para la reproducción; cría inadecuada de terneros y la adquisición de animales de reemplazo (Ellis y col, 1985, Alonso-Andicoberry y col 2001, Lilenbaum y col, 2009; Oliveira y col. 2010).

En la actualidad, no se dispone de estimaciones de factores de riesgo asociados a infección por Leptospirosis en establecimientos lecheros de Uruguay. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de Leptospirosis a nivel de rebaños lecheros.

Materiales y Métodos

En el capítulo 2 describe el diseño de muestreo y el análisis de laboratorio de las muestras.

Encuesta

La encuesta se realizó a través de entrevistas personales con la persona a cargo del establecimiento, utilizando un cuestionario que en su mayoría consideró preguntas cerradas, características generales del predio, indicadores reproductivos y características sanitarias. El cuestionario utilizado fue parte de un estudio más general sobre enfermedades reproductivas (Capítulo 3). La mayoría fueron preguntas cerradas (23) y la minoría abiertas (3) (Tabla 1).

Además, se contó con el estudio de población, el cual surge de la declaración jurada de DICOSE julio 2014, de donde se extrajo información sobre la cantidad de bovinos, ovinos, suinos, equinos y caninos y la cantidad de hectáreas utilizadas para la producción lechera. Con éstos últimos datos se pudo calcular la densidad animal (bovinos/hectáreas). Y el tamaño en hectáreas de cada predio.

Tabla 1. Resumen de encuesta realizadas a productores lecheros del Uruguay durante el segundo semestre del año 2015.

Variable	Tipo Variable	Nivel
1. Características generales		
Tamaño del predio (estratos)		1-50
	Estrato	51-250
		>250
Introducción hembras de reemplazo	Categórica	Yes/No
Origen de la entrada de animales	Categórica	
Asistencia veterinaria	Categórica	Yes/No
N° de caninos	Continua	
N° de suinos	Continua	
N° de ovinos	Continua	
N° de equinos	Continua	
N° de animales/ha	Continua	
1.1 Suplementación		
Fardo	Categórica	Yes/No
Silo	Categórica	Yes/No
Heno	Categórica	Yes/No
2. Datos y manejo sanitario		
Evaluación de toros	Categórica	Yes/No
Vacunación de toros	Categórica	Yes/No

Uso de inseminación artificial (IA)	Categórica	Yes/No
Uso de IA y toros	Categórica	Yes/No
Refugio sanitario	Categórica	Yes/No
Refugio por dentición	Categórica	Yes/No
Refugio reproductivo	Categórica	Yes/No
2.1 Vacunación		
Leptospirosis	Categórica	Yes/No
Brucelosis	Categórica	Yes/No
BVD	Categórica	Yes/No
IBR	Categórica	Yes/No
2.2 Antecedentes de enfermedades reproductivas		
Leptospirosis	Categórica	Yes/No
Brucelosis	Categórica	Yes/No
BVD	Categórica	Yes/No
IBR	Categórica	Yes/No
Campylobacteriosis	Categórica	Yes/No
Trichomoniasis	Categórica	Yes/No
Neosporosis	Categórica	Yes/No
3. Performance reproductiva		
Tasa de parición	Continua	
Largo de la estación reproductiva	Continua	
Tasa de preñez	Continua	
Número de abortos en el último año	Continua	
Nacimiento de terneros débiles	Categórica	Yes/No
Repetición de celos	Categórica	Yes/No
4. Prevalencia de otras enfermedades		
Neosporosis	Categórica	Yes/No
IBR	Categórica	Yes/No
DVB	Categórica	Yes/No

Se contó con los registros de movimientos de hembras de reemplazo de cada predio seleccionado para el muestreo, la variable se categorizó en dicotómica en reemplazo o no de hembras en el año 2014/2015.

Además, también se contó, en el mismo período de estudio, con los datos de seroprevalencia a nivel predial de Diarrea viral bovina (DVB), Leucosis bovina enzoótica (LBE) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), con los cuales se trató de buscar asociaciones entre estas enfermedades y la Leptospirosis.

Análisis estadístico

Los resultados de la prueba serológica se ingresaron en una base de datos en Microsoft Excel© y Stata 15 (StataCorp. LP). Se realizó un primer análisis de datos para encontrar observaciones faltantes y valores atípicos mediante el uso de histogramas, tablas de 2 x 2 y medidas de resumen.

Un animal fue considerado seropositivo cuando tenía un título de MAT ≥ 100 contra cualquiera de las serovariedades seleccionadas para realizar la prueba de MAT. Un establecimiento se definió como positivo si al menos uno de los animales muestreados era positivo al título de corte preestablecido. Por el contrario, se definió un establecimiento negativo si todas las muestras analizadas eran seronegativas para las serovares enfrentadas a la prueba. Se procesaron 4269 animales y 101 predios.

A partir de los resultados del MAT se estableció una variable dicotómica la cual definió a los predios como seropositivo (caso) o seronegativo (control) a *Leptospira spp.* Las asociaciones se analizaron en 2 pasos: en primer lugar, mediante una comparación cruda de los potenciales factores de riesgo con la variable respuesta (predio caso/control); segundo, por regresión logística multivariada (RLM). El nivel de asociación entre la variable respuesta e independiente (datos de la encuesta), se estimó mediante un análisis univariado, el cual consistió en un χ^2 de Wald para el caso en que la variable independiente fuera categórica, y regresión logística en caso de variables continuas.

En la RLM se incluyeron las variables independientes con un valor de p de la prueba de $\chi^2 \leq 0,2$. Se realizó un estudio de colinealidad por medio del coeficiente de correlación de Spearman, se tomó como coeficiente un valor $>0,7$, si dos variables estaban correlacionadas se mantenía en el análisis aquella que tuviera mayor relación con la variable de respuesta. Las variables relevadas han sido propuestas como potenciales factores de riesgo lo cual es importante detectar a los efectos de la prevención y/o control de la enfermedad. Uno de los principales criterios para establecer la causalidad de un factor es la fortaleza de la asociación estadística entre la enfermedad o sus indicadores y el factor analizado y es en este sentido que nos planteamos a través de estos modelos ver la asociación de estos factores y controlar por potenciales factores que puedan estar confundiendo esa asociación. Se eligió un método de selección directa para evaluar la exposición y las variables de confusión, agregando al modelo una variable a la vez

(forward). El posible efecto de confusión se analizó por el método estadístico de Mantel-Haenszel además el modelo tuvo en cuenta posibles factores de interacción. Se evaluaron los modelos a través de la prueba de “goodness of fit”, que considera qué tan bien se alinearon los resultados observados con los esperados predichos por el modelo de regresión logística (Hosmer y col., 1997). Los rodeos vacunados no se excluyeron del análisis, pero el efecto de la vacunación se controló en el modelo de regresión como una variable de efecto fijo.

Resultados

En el análisis univariado 16 variables tuvieron una $p \leq 0,2$ (Tabla 2). Hubo colinealidad entre las variables "origen " e "introducción de hembras de reemplazo", con un coeficiente de correlación de Spearman de 0.8. Se seleccionó la variable "introducción de hembras de reemplazo" para proceder con el análisis de regresión lineal múltiple (MLR). Los resultados se describen en la Tabla 4. El análisis estadístico univariado, fue realizado sobre las todas las variables a partir de análisis de Chi ² de Wald. Los resultados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del análisis univariado de los factores asociados investigados en tambos de Uruguay

Variable	tipo	OR	(IC 95%) ^c	valor-p	n ^a
Estrato bovinos	Discreta categórica	3,72	(1,48-9,32)	0,01	101
Reemplazo de hembras/año	Dicotómica	1,50	(3,04-73,96)	0,01	82
Orígenes entradas	Cuantitativa discreta	1,72	(3,8-78,16)	0,01	101
Hectáreas declaradas	Continua	1,00	(0,99-1,00)	0,17	100
Presencia de equinos	Dicotómica	7,49	(1,31-42,66)	0,02	84
Presencia de caninos	Dicotómica	2,47	(0,60-10,11)	0,20	100
Presencia de suinos	Dicotómica	3,28	(0,64-16,79)	0,15	100
Suplementación con ración	Dicotómica	2,26	(0,619-8,31)	0,21	95
Suplementación con silo	Dicotómica	2,74	(0,76-9,78)	0,12	95
Abortos mayor a otros años	Dicotómica	0,13	(0,01-1,01)	0,05	62
Número de abortos	Continua	1,34	(1,04-1,72)	0,02	64
Refugo por edad	Dicotómica	0,34	(0,06-1,81)	0,20	81
Refugo por segunda	Dicotómica	0,18	(0,04-0,75)	0,02	82

Falla reproductiva					
Antecedentes de Leptospira	Dicotómica	1 (omitido)			51
Predio positivo a DVB	Dicotómica	1 (omitido)			101
Predio positivo a IBR	Dicotómica	2,87	(0,82-9,99)	0,09	101
Vacunación Leptospirosis ^b	Dicotómica	2,27	(0,58-8,85)	0,23	101

^a n indica cantidad de predios con los que se contaba con la información.

^b vacunación Leptospira se dejó en el modelo multivariado como efecto fijo

^c Intervalo de Confianza

Tras el análisis estadístico multivariado, hubo 2 variables que mostraron una clara asociación con el estado de Leptospirosis del rebaño ($p < 0.05$): tamaño poblacional (distribuido en estratos) y entrada de hembras al rebaño en los últimos 12 meses (Tabla 3). No se encontraron interacciones ni factores de confusión en el modelo.

Tabla 3. Modelo de Regresión multivariado.

Variables	OR (IC 95%)	p OR
Estrato (numero bovinos)	base	
1-50		
51-250	3,27 (0,77- 13,80)	0,10
>250	16,20 (1,24-211,67)	0,03
Entrada de Hembras / año	15,55(3,16-76,48)	0,00
Vacunación Leptospirosis ^a	0,92 (0,36 -2,66)	0,92

^a Vacunación Leptospira se dejó en el modelo multivariado como efecto fijo

Discusión

El modelo de factores asociados contempló a la enfermedad en forma general como predio seropositivo o seronegativos a Leptospirosis (variable categórica dicotómica) y no discriminado por serogrupos/serovares. Debe mencionarse que frente a una multitud de serovares, existen relaciones ecológicas diferentes entre el hospedero y el ambiente lo cual haría que cada variable contenida en el análisis podría tener un comportamiento diferente si se discrimina por serogrupo/serovar. Algunos autores han decidido discriminar el análisis por serogrupo/serovar (Hathaway, 1981, Dreyfus y col, 2016). En nuestro país debido a la distribución endémica de las serovares hizo que se tomara la decisión de simplificar el modelo de esta forma.

A pesar de que en el análisis univariado 16 variables tuvieron valores de $p \leq 0,2$, solo 2 variables resultaron estadísticamente significativas en el modelo multivariado. Un factor importante a destacar es la cantidad de valores faltantes en algunas de estas variables, lo que dificultó la inclusión en el modelo al disminuir el n de la muestra utilizada.

Los estudios publicados sobre los diferentes factores de riesgo asociados a la Leptospirosis bovina varían mucho en las diferentes partes del mundo. Alguno de los factores de riesgo de infección encontrados a nivel de establecimientos lecheros son: el tamaño del rebaño, la región geográfica de las explotaciones, el movimiento de animales entre predios, el pastoreo conjunto con otras especies, la asistencia veterinaria, la cría de terneros de forma natural, las vacas adultas en contacto con los terneros, introducción de toros infectados y la contaminación de los cursos de agua (van Schaik y col., 2002; Leonard y col., 2004; O' Doherty y col., 2014; Salgado y col., 2014). Como se mencionó anteriormente, una de las razones por la cuales se encuentran diferentes asociaciones entre diferentes variables y la seropositividad podría estar atribuida a la diferente epidemiología de la Leptospirosis (diferentes variantes) en los rebaños y en las diferentes condiciones ambientales donde se realizaron los estudios (Hathaway, 1983).

Varios autores han planteado la discusión si la cría conjunta de bovinos con otras especies o el pastoreo conjunto es un factor de riesgo para la seroprevalencia de *Leptospira spp.* a nivel individual o de rebaño. En algunos de estos trabajos se observó que bovinos que pastoreaban conjuntamente con ovejas, cabras, cerdos y otras especies, tenían más probabilidades de presentar títulos de anticuerpos contra un gran número de serovares. Existen varios estudios donde han encontrado estas asociaciones, sin embargo, muchos de estos trabajos presentan diseños de muestreo que son diferentes, lo que dificulta la comparación con los resultados de este ensayo y también entre ellos (Oliveira y col., 2010; Marques y col., 2010; Subharat y col., 2012). En nuestro estudio el análisis individual del pastoreo conjunto de los bovinos con otra especie domésticas no aumentó las probabilidades de seroprevalencia de Leptospirosis, aunque sí pudo visualizarse en el análisis univariado no así cuando realizamos la RLM.

La ausencia de asistencia veterinaria, o su escasa frecuencia, también se asoció a la seroprevalencia global de la Leptospirosis (Lilenbaum y col, 2003). Así mismo la estación del año, como la fuente de agua fueron factores que resaltan en otras publicaciones. En nuestro ensayo no se recabo la información de tipos de cursos de agua o consumo de la misma, así como de la presencia de animales silvestres.

El movimiento de hembras bovinas entre predios se logró asociar con los niveles de infección (OR 15,5). Tal como se reportó, el 53% de los predios presentaron al menos alguna entrada de hembras de remplazo en el último año, de los cuales el 96,23% tienen algún animal seroreactivo a *Leptospira spp.* patógena, lo que seguramente este explicando estos resultados. Miyama y col (2018) realizan un estudio de factores de riesgo vinculado a la presencia de género *Leptospira* sv Hardjo en Japón, ellos encuentran 2 factores de riesgo asociados, el mayor tamaño del rebaño y las vacas de remplazo comparadas en la región de Hokkaido. Otros trabajos reportan resultados similares, en Nepal también se reporta el tamaño de rodeo y la compra de animales como factores de riesgo (Gompo y col, 2020). Como se mencionó anteriormente varios autores vinculan el tamaño poblacional como factor de riesgo. Algunos autores sugieren que el tamaño del rodeo puede aumentar la posibilidad de que los animales susceptibles entren en contacto con la orina de animales infectados con *Leptospira spp.* patógenas. (Hathaway, 1981; Leonard y col., 2004; Ryan y col., 2012; O'Doherty y col., 2013). Los establecimientos más grandes presentan mayor riesgo de exposición a la enfermedad, siendo este factor un denominador común para varias enfermedades infecciosas. Las infecciones pueden transmitirse más fácilmente y persistir durante más tiempo en rebaños de mayor tamaño (Hathaway, 1981).

Hay que señalar que los intervalos de confianza para ambas variables (tamaño poblacional y movimiento de hembras) fue amplio (esperable dado el limitado tamaño muestral), esto significa que a pesar de que las variables fueron significativas la fuerza de asociación entre estas variables y la seropositividad a Leptospirosis es variable.

Conclusión

Uruguay presenta un alto nivel de endemismo lo cual hace difícil medir el efecto de ciertas variables como posibles factores de riesgo. Sin embargo, hubo 2 variables que

se desmarcaron de este patrón y fueron significativas. El tamaño poblacional y la entrada de hembras de reemplazo, estas dos variables sugerirían un mayor control de los animales nuevos que entran a los predios. Los programas de control deben tener en cuenta el riesgo de introducir animales sin pruebas previas ni historial de vacunación.

Es importante continuar explorando el estudio de esta enfermedad desde una perspectiva de “Una Salud”, ya que existe la transmisión directa de *Leptospira spp.* del ganado infectado a los humanos a través de contacto con orina contaminada o fuentes ambientales. Esta situación subraya la preocupación desde el punto de vista de salud pública, más allá de su impacto en la productividad ganadera. El potencial zoonótico de la Leptospirosis bovina genera alarma, enfatizando la necesidad de una vigilancia integral, estrategias de control y el abordaje con un enfoque de “Una Salud”.

Bibliografía

1. Adler, B. (2015). Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer.
2. Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. J., Pereira-Bueno, J., Costas, E., & Ortega-Mora, L. M. (2001). Herd-level risk factors associated with *Leptospira spp.* seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Preventive Veterinary Medicine, 52(2), 109–117.
3. Benacer, D., Woh, P. Y., Mohd Zain, S. N., Amran, F., & Thong, K. L. (2013). Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in Peninsular Malaysia. Microbes and Environments, 28(1), 135–140.
4. Bharti, A. R., Nally, J. E., & Ricaldi, J. N. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. Lancet Infectious Diseases, 3, 757-771.
5. Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M., & Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases, 3(12), 757-771.
6. Dorjee, S., Heuer, C., Jackson, R., West, D. M., Collins-Emerson, J. M., Midwinter, A. C., & Ridler, A. L. (2008). Prevalence of pathogenic *Leptospira spp.* in sheep in a sheep-only abattoir in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal, 56(4), 164–170.

7. Dreyfus, A., Dyal, J. W., Pearson, R., Kankya, C., Kajura, C., Alinaitwe, L., Kakooza, S., Pelican, K. M., Travis, D. A., Mahero, M., Boulware, D. R., & Mugisha, L. (2016). *Leptospira* seroprevalence and risk factors in health centre patients in Hoima District, Western Uganda. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8).
8. Easton, C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Identificación de la acción de agentes infecciosos vinculados con el aborto bovino. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay, 57.
9. Ellis, W. A., & Michno, S. W. (1976). Bovine Leptospirosis: A serological and clinical study. *The Veterinary Record*, 99(20), 387–391.
10. Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Bryson, D. G., & Mackie, D. P. (1985). Bovine Leptospirosis: Some clinical features of serovar Hardjo infection. *Veterinary Record*, 117, 101–104.
11. Genovez, M. E., Escocio, C., Castro, V., Gabriel, F. H. L., Chiebao, D. P., & Azevedo, S. S. (2011). Risk factors associated with *Leptospira spp.* serovar Hardjo infection in sheep-only herds and in sheep-cattle herds. *Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)*, 78, 587–592.
12. Gil, A. D. (2001). Monitoreo sanitario en rodeos lecheros en Florida. En: Aspectos Sanitarios y Reproductivos en Bovinos (pp. 47-56). Seminario JICA/DILAVE, Miguel C. Rubino, Treinta y Tres, Uruguay.
13. Gompo, T. R., Jyoti, S., Pandit, S., Sapkota, R. C., & Pandey, A. (2020). Sero-prevalence and risk factors of Leptospirosis in commercial cattle herds of Rupandehi District, Nepal. *bioRxiv*, 226464.
14. Hathaway, S. C. (1981). Leptospirosis in New Zealand: An ecological view. *New Zealand Veterinary Journal*, 29(7), 109–112.
15. Hathaway, S. C., & Little, T. W. A. (1983). Epidemiological study of *Leptospira* Hardjo infection in second-calf dairy cows. *Veterinary Record*, 112(10), 215–218.
16. Hosmer, D. W., Hosmer, T., Le Cessie, S., & Lemeshow, S. (1997). A comparison of goodness-of-fit tests for the logistic regression model. *Statistics in Medicine*, 16, 965–980.
17. Jansen, A., Schöneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T., & Stark, K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerging Infectious Diseases*, 11(7), 1048–1054.

18. Leonard, N., Mee, J. F., Snijders, S., & Mackie, D. (2004). Prevalence of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in bulk tank milk from unvaccinated Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*, 57, 226.
19. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326.
20. Lilenbaum, W., & Souza, G. N. (2003). Factors associated with bovine Leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*, 75(3), 249–251.
21. Lilenbaum, W., Varges, R., Ristow, P., Cortez, A., Souza, S. O., Richtzenhain, L. J., & Vasconcellos, S. A. (2009). Identification of *Leptospira spp.* carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*, 87, 16–19.
22. Marano, N., Arguin, P., Pappaioanou, M., Chomel, B., Schelling, E., Martin, V., Butler, J. C., Ben Beard, C., & King, L. (2006). International attention for zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1813–1815.
23. Marques, A. E., Rocha, W. V., Brito, W. M. E. D., Fioravanti, M. C. S., Parreira, I. M., & Jayme, V. D. S. (2010). Prevalence of anti-*Leptospira spp.* antibodies and epidemiological aspects of the infection in cattle of Goiás/Brazil. *Ciencia Animal Brasileira*, 11, 607–617.
24. Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., Urushiyama, Y., Kawahara, N., & Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 149, 15–20.
25. O'Doherty, E., Berry, D. P., O'Grady, L., & Sayers, R. (2014). Management practices as risk factors for the presence of bulk milk antibodies to *Salmonella*, *Neospora caninum*, and *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in Irish dairy herds. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 8(6), 1010–1019.
26. Oliveira, F. C. S., Azevedo, S. S., Pinheiro, S. R., Batista, C. S. A., Moraes, Z. M., Souza, G. O., Goncalves, A. P., & Vasconcellos, S. A. (2010). Risk factors associated with Leptospirosis in cows in the state of Bahia, northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 398–402.
27. Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297-307.

28. Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., & 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.
29. Ryan, E. G., Leonard, N., Grady, L. O., Doherty, M. L., & More, S. J. (2012). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 65, 6.
30. Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G., & Boqvist, S. (2014). A cross-sectional observational study to estimate herd-level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in smallholder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*, 10, 126.
31. Subharat, S., Wilson, P. R., Heuer, C., & Collins-Emerson, J. M. (2012). Longitudinal serological survey and herd-level risk factors for *Leptospira* spp. serovars Hardjo-bovis and Pomona on deer farms with sheep and/or beef cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 60, 215–222.
32. van Schaik, G., Schukken, Y. H., Nielen, M., Dijkhuizen, A. A., Barkema, H. W., & Benedictus, G. (2002). Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: A cohort study. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(3), 279–289.
33. Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Ríos, C., & Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium. (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).

VI CONCLUSIONES GENERALES

La MAT presentó un aumento de sensibilidad cuando se utilizaron cepas locales como antígeno. Esta inclusión podría detectar animales positivos que actualmente no están siendo detectados por las cepas de referencia lo que redundaría en una detección temprana de la enfermedad. Sin embargo, es necesario realizar estudios con un número mayor de muestras que permitan obtener una estimación más robusta.

Se generó información sobre las características reproductivas y el manejo sanitario empleado en la cuenca lechera del Uruguay recabado a partir de una encuesta. Al igual que en otros países el análisis de esta encuesta pudo revelar que el aspecto demográfico cumple un rol significativo en la elección de los aspectos reproductivos, sanitarios y de manejo, donde los predios de más de 250 bovinos presentan características distintivas respecto a predios con tamaños menores.

Se cumplió con el objetivo de medir la seroprevalencia de *Leptospira spp.* en bovinos lecheros a nivel nacional en Uruguay mediante un muestreo representativo de toda la población. Se observó un incremento en la seroprevalencia de leptospirosis comparado con estudios previos. La vacunación mostró un impacto notable, sobrestimando la exposición real a la enfermedad en animales vacunados.

La serovar Hardjo y serovar Kennewicki resultaron ser las más prevalente, asociándose la primera con leptospirosis crónica en bovinos. El estudio subraya la importancia del bovino como hospedador de mantenimiento de *Leptospira*, especialmente Hardjo, y la necesidad de implementar medidas de control adecuadas a nivel predial.

Este estudio investigó los potenciales factores de riesgo de seropositividad a leptospirosis en rebaños lecheros, utilizando un diseño de muestreo representativo a nivel nacional. Aunque 16 variables mostraron relevancia en el análisis univariado, solo 2 resultaron significativas en el modelo multivariado.

Uruguay presenta un alto nivel de endemismo, lo que dificulta evaluar el impacto de ciertas variables como factores de riesgo potenciales. Sin embargo, dos variables se

destacaron y mostraron ser significativas: el tamaño poblacional y la entrada de hembras de reemplazo. Estas variables sugieren la necesidad de un mayor control sobre los animales nuevos que ingresan a los predios. Los programas de control deben considerar el riesgo de introducir animales sin pruebas previas ni historial de vacunación.

Es crucial continuar investigando esta enfermedad debido a la posibilidad de transmisión directa de *Leptospira* desde el ganado infectado a los humanos, a través del contacto con orina contaminada o fuentes ambientales. Esto subraya la preocupación por la salud pública, además del impacto en la productividad ganadera. El potencial zoonótico de la leptospirosis bovina es alarmante, lo que enfatiza la necesidad de una vigilancia integral, estrategias de control y la aplicación de enfoques de Una Salud.

VII PUBLICACIONES

Artículos científicos publicados en el marco de la tesis doctoral:

***Primer autoría compartida:** Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni.

1. Zarantonelli, L., **Suanes, A***, Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Ríos, C. Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium (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).
2. **Suanes, A.**, Macchi, V., Fernández, F., Salaberry, X., Moreira, C., & Gil, A. (2021). Características reproductivas, sanitarias y de manejo en establecimientos lecheros del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(215), e20215721503.
3. **Suanes, A.**, Macchi, M. V., Fernández, F., Salaberry, X., Moreira, C., & Gil, A. D. (2024). Seroprevalence and herd-level associated factors of pathogenic *Leptospira spp.* circulating locally in dairy cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary medicine*, 223.

Comunicación oral en talleres o congresos publicados con resultados de la tesis doctoral.

1. Seroprevalencia de Leptospirosis bovina en la cuenca lechera del Uruguay. **Suanes A**, Salaberry X, Fernández F, Nuñez A, Piaggio J, Barrandeguy N3, Avila G, Martinelli M, Mortola A, Macchi V, Gil A. 3 er Congreso SIEVMP, Valdivia, Chile, octubre 2017.
2. Seroprevalencia de Leptospirosis bovina en ganado de carne y leche de Uruguay. Mayo de 2018 Sociedad Rural de Durazno. **Alejandra Suanes**