



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y CINÉTICA DE DISEMINACIÓN E
INMUNOGENICIDAD DE LA INFECCIÓN POR *Leptospira* spp. AUTÓCTONAS
EN UN MODELO EXPERIMENTAL BOVINO**

MARIANA BARRIOS INTHAMOUSSU

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2025**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

**CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y CINÉTICA DE DISEMINACIÓN E
INMUNOGENICIDAD DE LA INFECCIÓN POR *Leptospira* spp. AUTÓCTONAS
EN UN MODELO EXPERIMENTAL BOVINO**

MARIANA BARRIOS INTHAMOUSSU

Dr. Mizaet Machado
Director de Tesis

Dra. Leticia Zarantonelli
Co-directora

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Franklin RIET CORREA; DTMV, MS, PhD
Universidade Federal de Campina Grande,
Brazil.**

**María Laureana DE BRUN; DTMV, MS, PhD
Facultad de Veterinaria,
Universidad de la República, Uruguay.**

**Luis Gustavo CAL; DTMV, PhD
Facultad de Veterinaria,
Universidad de la República, Uruguay.**



Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Maestría en Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 13/03/2025

TRIBUNAL: Dr. Franklin Riet-Correa (Presidente). Dra. Laureana de Brun.
Dr. Luis Cal.

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4999079-9	MARIANA BARRIOS INTHAMOUSSU	Excelente	E

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

TRIBUNAL

FIRMA

Franklin Riet -Correa

Laureana de Brun

Luis Cal

AGRADECIMIENTOS

Al director Dr. Mizael Machado y la co-directora Leticia Zarantonelli, por su compromiso, dedicación y paciencia.

A la Dra. Fabiana Boabaid y Dr. Luiz de Oliveira, por su apoyo en la parte práctica del trabajo y el incentivo e impulso a realizar la tesis de maestría.

A la Dra. Camila Ciuffo, por su enseñanza y acompañamiento en el procesamiento de las muestras.

A INIA Tacuarembó y Unidad Experimental La Magnolia, por las terneras y las instalaciones de ensayo.

A la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA), sede Tacuarembó, por brindar la estructura y apoyo técnico para realización del trabajo experimental con bovinos.

Al laboratorio de la DILAVE de Tacuarembó que nos brindó el espacio para el procesamiento de las muestras.

Alejandra Custodio, Técnica en Anatomía Patológica de la PSA Tacuarembó, por el procesamiento de las láminas histológicas.

Al Dr. Federico Giannitti y Yisell Perdomo, PSA La Estanzuela, por realización de la inmunohistoquímica.

A la Dra. Ana Vildoza y estudiantes de Veterinaria que me ayudaron con las tomas de orina.

A la Dra. Sabrina Pimentel colaboró con la preparación de las muestras de orina.

A la UMPI, por brindarnos el laboratorio para procesamiento, diagnóstico y resultados del trabajo.

A la Universidad de la República y Facultad de Veterinaria por su enseñanza en lo académico y en lo personal.

Al Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria (PPFV) por la oportunidad y apoyo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación de la beca.

A mi madre y a mis tres hermanos por escucharme y apoyarme siempre en lo que me propuse.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	12
2.1 Leptospirosis: zoonosis causada por especies patógenas del género <i>Leptospira</i>	12
2.2 Aspectos de patogénesis e interacción de especies patógenas de <i>Leptospira</i> con el hospedero	13
2.2.1 Leptospiremia	14
2.2.2 Leptospiruria	14
2.2.3 Forma reproductiva de la leptospirosis en bovinos	14
3. Epidemiología	15
4. Signos clínicos	17
5. Patología	18
6. Diagnóstico	19
6.1 Diagnóstico serológico mediante prueba de aglutinación microscópica	19
6.2 Examen microscópico directo	19
6.3 Cultivo microbiológico	19
6.4 Técnicas moleculares	20
6.5 Tinción argéntica	20
6.6 Inmunohistoquímica	20
7. Control y profilaxis	21
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
9. HIPÓTESIS	23
10. OBJETIVOS	23
10.1 Objetivo general	23
10.2 Objetivos específicos	23
11. MATERIALES Y MÉTODOS	24
11.1 Diseño experimental	24

11.2 Selección de animales sin evidencia de exposición a la infección por <i>Leptospira</i> spp.	24
11.3 Inoculación con variantes autóctonas de <i>Leptospira</i> spp. a través de mucosas	25
11.4 Cronograma	26
11.5 Seguimiento de parámetros clínicos	27
11.6 Obtención de muestras biológicas para seguimiento de la cinética de infección por <i>Leptospira</i> spp.	27
11.7 Determinación de anticuerpos anti- <i>Leptospira</i> mediante test de microaglutinación (MAT)	27
11.8 Detección de ADN de <i>Leptospira</i> spp. mediante amplificación del gen <i>lipL32</i> por PCR en tiempo real	28
11.9 Detección de <i>Leptospira</i> spp. mediante cultivo microbiológico	29
11.10 Autopsia e histopatología	29
11.11 Inmunohistoquímica	30
12. RESULTADOS	31
12.1 Cuadro clínico	31
12.2 Cinética de la infección por <i>Leptospira</i> spp. en terneras infectadas a través de mucosas	31
12.3 Detección de <i>Leptospiras</i> patógenas en órganos blanco	33
12.4 Estudio de la capacidad inmunogénica post-infección mediante determinación de títulos de anticuerpos aglutinantes anti- <i>Leptospira</i>	35
12.5 Autopsia e histopatología	37
12.6 Inmunohistoquímica	41
13. DISCUSIÓN	43
14. 4615. 47	

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de infección a través de mucosas, cinética de diseminación, inmunogenicidad y el cuadro lesional de cuatro variantes de *Leptospira* spp. autóctonas: *Leptospira noguchii* sg Autumnalis, *Leptospira interrogans* sg Pomona sv Kennewicki, *Leptospira borgpetersenii* sg Sejroe sv Hardjo y *Leptospira interrogans* sg Canicola sv Canicola, en un modelo experimental bovino. Para esto se utilizaron 20 terneras Braford de tres meses de edad, de madres/terneras seleccionadas con test serológico y molecular negativo a leptospira; divididas en 5 grupos (cuatro infectantes y un grupo control). Se inoculó por vía intranasal e intraconjuntival simultáneamente las distintas variantes a cada grupo ($n=4$) y fueron evaluadas durante 21 días post-infección (p.i). Ninguna de las variantes ocasionó enfermedad aguda y lesiones macroscópicas en las terneras en los 21 p.i. Histológicamente, se observó nefritis, hepatitis, miocarditis y colecistitis linfocitaria, en los cuatro grupos infectantes. En la tinción de Warthin-Starry se observaron leptospiras en la luz de túbulos renales en animales infectados con las cuatro variantes. Se observó inmunomarcación positiva en riñón, hígado y vesícula biliar. Las cuatro variantes estudiadas fueron detectadas por qPCR y cultivo microbiológico en riñón, hígado y orina. Además, la variante Kennewicki fue detectada por qPCR y cultivo en sangre y la variante Autumnalis se detectó mediante qPCR y cultivos en útero. Se logró obtener cultivos puros de la variante Kennewicki de muestras de orina; y de la variante Canicola de muestras de orina, hígado y riñón. En cuanto a la serología (MAT), se detectaron títulos de anticuerpos en los cuatro grupos infectantes. En conclusión, las cuatro variantes utilizadas demostraron ser infectivas, inmunogénicas y presentaron un patrón sistémico de infección, sin embargo, no desencadenaron enfermedad clínica ni lesiones macroscópicas en 21 días p.i. A nivel histopatológico, se observó colecistitis, lesión reportada anteriormente en humanos afectados por leptospirosis pero que no había sido descrita en bovinos.

SUMMARY

This study aimed to determine the infectivity through mucosal routes, dissemination kinetics, immunogenicity, and lesion patterns of four autochthonous *Leptospira* spp. variants: *Leptospira noguchii* serogroup Autumnalis, *Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki, *Leptospira borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Hardjo, and *Leptospira interrogans* serogroup Canicola serovar Canicola, using an experimental bovine model. Twenty-three-month-old Braford heifers, born to dams/heifers selected based on negative serological and molecular tests for *Leptospira*, were used. The heifers were divided into five groups (four infected groups and one control group). Each group (n=4 per group) was inoculated simultaneously via the intranasal and conjunctival routes with one of the four *Leptospira* variants and monitored for 21 days post-infection (dpi). None of the variants caused acute disease or macroscopic lesions in the heifers during the 21-day observation period. However, histological examination revealed lymphohistiocytic nephritis, hepatitis, myocarditis, and cholecystitis in all infected groups. Warthin-Starry staining revealed the presence of leptospire in the lumen of renal tubules in heifers infected with all four variants. Positive immunolabeling was observed in the kidney, liver, and gallbladder. All four variants were detected by qPCR and bacterial culture in the kidney, liver, and urine. Additionally, the Kennewicki variant was detected in blood by both qPCR and culture, and the Autumnalis variant was detected in the uterus by qPCR and culture. Pure cultures of the Kennewicki variant were successfully obtained from urine samples, and of the Canicola variant from urine, liver, and kidney samples. Serological testing (MAT) revealed antibody titers in all four infected groups. In conclusion, the four *Leptospira* variants used in this study proved to be infectious and immunogenic, exhibiting a systemic pattern of infection. However, they did not cause clinical disease or macroscopic lesions within 21 dpi. Histopathologically, cholecystitis was observed—a lesion previously reported in humans with leptospirosis but not described in cattle previously.

1. INTRODUCCIÓN

El Uruguay, es un país agroexportador, constituyendo la agricultura y la ganadería engranajes centrales de la economía. En el contexto global, es el séptimo exportador de leche (Instituto Nacional de la Leche [INAC], 2021; Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca [MGAP], 2019) y octavo exportador de carne (Instituto Nacional de la Carne [INAC], 2021). Posee un rebaño total de 11.689.152 bovinos (MGAP, 2023) y tasas de preñez promedio 73% y destete 62%.

Recientemente, un estudio realizado por el Comité de Coordinación en Investigación en Salud Animal (CCISA) demostró que Uruguay pierde anualmente 800 millones de dólares por problemas relacionados a salud animal. Al menos en parte estos resultados pueden ser atribuidos a factores que impactan negativamente los rodeos, como las pérdidas reproductivas (Bañales et al., 2006; Easton, 2006; Garcia-Pintos et al., 2021; Macchi et al., 2024; Macías-Rioseco et al., 2020; Repiso et al., 2005), alta mortalidad de terneros (Schild et al., 2020) y alta tasa de descarte de vacas (Doncel, 2022). Como resultado, el stock bovino total ha decrecido un 3% respecto al año anterior y se mantiene por debajo del promedio de la década (2012-2022) (INAC, 2021; MGAP, 2019).

Entre las enfermedades reproductivas la leptospirosis posee alta relevancia en los programas de sanidad animal por su impacto en la producción y potencial zoonótico. De acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), las vacunas contra la leptospirosis constituyen una herramienta clave para el control de la enfermedad. Por ello, las vacunas utilizadas en el ganado vacuno deben contener preferencialmente los genotipos más relevantes para cada región ya que se considera una mejor inmunidad serotipo específica (OIE, 2021). Con base en ese principio, en 2018, en 12 de 19 departamentos, se muestrearon cuarenta y ocho establecimientos (ganado de carne y leche), donde se reportó una positividad individual de excreción de leptospiras patógenas en orina del 20% (193/963) y el 77% (37/48) de los establecimientos que se estudiaron presentaron al menos un animal excretando leptospiras patógenas (Zarantonelli et al., 2018). Además, fueron logrados 40 aislamientos que pertenecían a tres especies (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*) y siete serovares que ahora hacen parte de un banco para investigación.

En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el estudio de los factores inmunogénicos y patogénesis de las leptospiras patógenas, sin embargo, aun con esos esfuerzos, los mecanismos no fueron totalmente dilucidados. Tal constatación es más evidente cuando se consideran estudios realizados en economías emergentes. Por lo tanto, esa temática amerita ser abordada con mayor profundidad.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 Leptospirosis: zoonosis causada por especies patógenas del género *Leptospira*

La leptospira fue identificada en humanos por primera vez por Stimson, (1907) y en ese momento fue nombrada *Spirochaeta interrogans*. Posteriormente, Inada et al., (1916); Wolbach & Binger, (1914) dividieron el género en leptospiras patógenas (P) y saprófitas (S). Recién en 1940, en Rusia se informó los primeros casos de leptospirosis en el ganado, nombrándola “Fiebre amarilla infecciosa del ganado” (Semskov, 1940). En la década del 50, ya estaba expandida (Alston & Broom, 1958) y en el 1980 estaba establecida como enfermedad veterinaria causando daño a numerosas especies animales (Ellis, 1990). En humanos, la presentación de leptospirosis grave es conocida como “Enfermedad de Weil’s” (Petakh et al., 2022).

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas, flexibles y móviles; su envoltura celular es similar a las bacterias Gram negativas (Nakamura, 2022). Su temperatura óptima de crecimiento *in vitro* es entre 28 a 30°C y en un medio de pH cercano a la neutralidad, que oscila entre 7,2 y 7,6. La temperatura mínima de crecimiento de las leptospiras patógenas oscila entre 13 a 15°C (Johnson & Harris, 1967).

La membrana externa contiene una variedad de lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41, LipL36, LipL45 y Loa22) y lipopolisacárido (LPS) importantes para la adhesión a los tejidos del huésped y resistencia del sistema inmune (Picardeau, 2017). *LipL32*, es la lipoproteína más abundante en la membrana externa y está altamente conservada en leptospiras patógenas, estimula la respuesta inflamatoria por medio de la interacción con el receptor TLR2 (Hsu & Yang, 2022). El LPS es una macromolécula constituida por tres partes: (i) el antígeno O, formado por un conjunto de unidades de azúcar repetidas de longitud variable que sobresalen por fuera de la bacteria, (ii) un núcleo de azúcares conservados y (iii) el lípido A que está anclado a la membrana externa. La estructura y composición en azúcares del antígeno O es lo que permite la clasificación fenotípica del género *Leptospira* en serogrupos y serovares.

Históricamente, la clasificación de las leptospiras viene sufriendo cambios por cuenta de la evolución de las técnicas moleculares. *Leptospira* corresponde al Dominio: Bacteria, Reino: Monera, Phylum: Spirochaetes, Clase: Spirochaetes, Orden: Spirochaetales, Familia: Leptospiraceae y Género: *Leptospira* (Faine et al., 1999; Harrison, 2006; Levett, 2015; Ritchie & Johnson, 1976). Estudios filogenéticos basados en el análisis de genomas completos permiten clasificar a las especies del género *Leptospira* en dos clados: P y S, dentro de los cuales es posible distinguir dos subclados P1-P2 y S1-S2 (Vincent et al., 2019). Recientemente, se han identificado 66 especies diferentes (Caimi & Ruybal, 2020), que se agrupan según la composición de su LPS en 31 serogrupos (Boey et al., 2019) y más de 300 serovares (Picardeau,

2017). En el subclado P1 se encuentran las especies patógenas que son aisladas con mayor frecuencia de casos de leptospirosis en humanos y en animales: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii* y *L. kirschneri* (Vincent et al., 2019).

2.2 Aspectos de patogénesis e interacción de especies patógenas de *Leptospira* con el hospedero

La fisiopatogenia de las especies patógenas del género *Leptospira* no está totalmente dilucidada, con numerosos trabajos que están focalizados principalmente en serovariedades de *L. interrogans* frecuentemente aisladas de casos de leptospirosis en humanos. Para un gran número de especies y serovariedades que causan enfermedad en diferentes especies de animales incluyendo el ganado bovino, los mecanismos inmunes siguen siendo desconocidos (Bonhomme & Werts, 2022).

La vía de entrada de las leptospiras es a través de las mucosas (ocular, respiratoria, oral y genital) y de la piel (debilitada por el contacto con el agua, con laceraciones o heridas). Son muy invasivas y su penetración se da por la acción de colagenasa y/o factores mecánicos asociados a su motilidad característica. El período de incubación desde la exposición hasta la aparición de los síntomas tiene un promedio de 7 a 14 días (Morgan et al., 2002), aunque puede ser tan corto como 3 días y tan largo como un mes (Haake & Levett, 2015). Existen diferentes formas de presentación de la enfermedad: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda se presenta generalmente en animales jóvenes y los síntomas son, ictericia, fiebre, apatía, hemoglobinuria, anorexia, seguida de la muerte del animal a las pocas horas de comenzar con la sintomatología, en animales adultos tormentas de aborto; la forma subaguda se da en vacas lactantes, y causa caída de la leche. La crónica ocasiona fallas reproductivas (Hamond & Riet-Correa, 2023).

Las leptospiras tienen dos endoflagelos que le confieren movilidad, contribuyendo al proceso invasivo en el hospedero. Se encuentran insertados en cada polo del cuerpo bacteriano y están localizados a nivel del periplasma en estrecho contacto con el peptidoglicano, gracias a su ubicación le permite evadir el reconocimiento del sistema inmune. El filamento flagelar está compuesto por diferentes proteínas: dos FlaAs (1 y 2), cuatro FlaBs (1-4) y dos proteínas asociadas a flagelos FcpA y FcpB (Gibson et al., 2020). Dispuestas de la siguiente forma: las FlaB forman el núcleo del filamento y las FlaA y las Fcp forman la vaina (Gibson et al., 2020).

La interacción del sistema inmune del hospedero con las leptospiras patógenas ocurre en primer lugar mediante interacción de los diferentes patrones moleculares asociados al patógeno, como el LPS o las lipoproteínas de membrana externa, con los receptores del sistema inmune innato: receptores de la familia TLR, NLR y NOD. TLR2 es el receptor que permite el reconocimiento de lipoproteínas y del LPS en el humano. En el ratón, el LPS de *Leptospira* es reconocido por el receptor TLR4 mediante su unión al lípido A del lipopolisacárido (Hsu et al., 2021). *Leptospira* es

capaz de activar el inflamasoma NLRP3 con la consecuente síntesis de IL-1 β y IL-18. Dicha activación del inflamasoma puede darse (i) luego de la interacción de la glicoproteína de membrana externa (GLP) con la bomba de sodio/potasio presente en la membrana de células fagocíticas (macrófagos), ó (ii) mediante la interacción el LPS leptospiral por los receptores TLR2/TLR4.

2.2.1 Leptospiremia

La primera fase de la infección sistémica es denominada bacteriemia (comienza 1 o 2 días después de la infección hasta 7 días). Las leptospiras alcanzan y se diseminan rápidamente vía hematogena, comienzan a multiplicarse; y a medida que progresa la infección sistémica, la bacteria se dirige a órganos con mayor tropismo (hígado, riñones, pulmón, placenta y ubre) (Cianciolo & Mohr, 2016). Las leptospiras se unen a inhibidores del sistema del complemento evadiendo el sistema inmune del hospedero a través de sus proteínas de membrana de la familia Lig (LigA, LigB y LigC) (Matsunaga et al., 2003), dañando las células endoteliales de capilares y pequeños vasos sanguíneos. A su vez, también puede causar hemólisis por acción de las hemolisinas y por daño de los hepatocitos ya sea por la isquemia y/o toxicidad de la bacteria (fosfolipasas) (Michael et al., 2013), principalmente en categorías jóvenes.

2.2.2 Leptospiruria

A continuación, se da la segunda fase, denominada leptospiruria, también referida como la fase inmune. El huésped desarrolla anticuerpos aglutinantes y opsonizantes y las leptospiras son removidas del torrente sanguíneo. Entonces invaden y colonizan el riñón, cámara anterior del ojo y otros tejidos con la finalidad de favorecer su supervivencia y pasar desapercibidas por el sistema inmune (Cianciolo & Mohr, 2016). Las leptospiras se desplazan vía hematogena hacia el riñón, su migración ocurre al azar, persistiendo poco tiempo en el intersticio provocando daño vascular. Luego ingresan en los túbulos en todos los niveles de la nefrona, se instalan primordialmente en los túbulos contorneados proximales, para luego multiplicarse (Cianciolo & Mohr, 2016).

Una vez en el riñón se alojan adheridas a las células epiteliales en la luz de los túbulos proximales, llevando al estado de portador crónico en donde elimina la bacteria a través de la orina por largos períodos (Hamond & Riet-Correa, 2023). Bovinos cursando la fase crónica pueden excretar bacterias hasta por 2 años (Meny et al., 2019).

2.2.3 Forma reproductiva de la leptospirosis en bovinos

La patogenia de la infección por especies patógenas de *Leptospira* en el tracto reproductivo de bovinos sigue siendo una incógnita. Algunos autores proponen que, en la fase de bacteriemia de la hembra gestante, la bacteria se transmite vía transplacentaria. La bacteria se deposita en el útero de hembras preñadas llevando a

infecciones intrauterinas que desencadenan abortos en el último tercio de la gestación, muerte fetal o nacimiento de crías débiles. Esta forma de presentación puede darse semanas o meses después de ocurrida la fase de bacteriemia en la madre, constituyendo la forma más importante de la enfermedad en rumiantes, debido a su impacto en las pérdidas reproductivas (Cianciolo & Mohr, 2016).

Además, las leptospiras pueden mantenerse en el oviducto y útero de hembras no gestantes y en el aparato genital de machos (Ellis et al., 1986). Estudios *in vitro* refieren que este microorganismo cuenta con la capacidad de adherirse y penetrar en la zona pelúcida para luego ingresar a células embrionarias (Bielanski & Surujballi, 1998). Como también depositarse por largos periodos en la glándula mamaria y sus nódulos linfáticos (Thiermann, 1982).

3. Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad antropozoonótica distribuida por todo el mundo (Bharti et al., 2003; Ellis, 1984). Las leptospiras pueden infectar hospederos de mantenimiento (principalmente roedores) u hospederos accidentales (humanos, animales domésticos y salvajes). Cuando una determinada especie y/o serovar de *Leptospira* infecta un hospedero accidental normalmente desarrolla un cuadro con síntomas clínicos que puede ser potencialmente fatal. Sin embargo, cuando la infección se da en un hospedero de mantenimiento, el mismo puede portar y propagar el microorganismo a través de la orina, sin sintomatología ni enfermedad evidente (Adler, 2015). Los hospederos de mantenimiento juegan un rol central como reservorio de la bacteria perpetuando el ciclo epidemiológico al diseminar la bacteria en el ambiente y hacia otros hospederos susceptibles que puedan estar en contacto estrecho con la orina o suelos y cursos de agua contaminados con ella.

Las leptospiras pueden sobrevivir durante períodos prolongados en un ambiente húmedo con temperaturas cálidas que estén alrededor de los 28°C (muriendo a temperaturas inferiores a los 10°C y superiores a los 35°C). Se ve favorecida la bacteria, en agua estancada y campos pantanosos pudiendo sobrevivir hasta 183 días, de lo contrario resiste 30 minutos cuando el suelo está seco. Tiene mayor prevalencia en zonas tropicales y subtropicales. Su incidencia aumenta durante los meses cálidos del año en climas templados o períodos lluviosos, por ello existen reportes de brotes de leptospirosis luego de lluvias torrenciales e inundaciones (Constable et al., 2017).

En humanos, la leptospirosis puede darse en dos escenarios, uno es cuando ocurre luego de grandes lluvias, inundaciones u otros desastres naturales y el otro escenario corresponde a las personas con riesgo ocupacional (Schneider et al., 2012; Tejada Caminiti et al., 2011). Se estima que 1,03 millones de personas son afectadas por leptospirosis cada año, con una ocurrencia de 58.900 muertes anuales a nivel mundial (Costa et al., 2015). En América del Sur, ocurren en promedio 2.400 casos

por año. En Uruguay, la leptospirosis en humanos es una enfermedad endémica que se presenta con brotes ocasionales y está fuertemente asociada a la actividad rural. En base a datos que reportan 162 casos de leptospirosis confirmados en el período entre junio de 2015 y junio de 2017, y teniendo en cuenta que es una enfermedad subdiagnosticada, se estima una incidencia anual de 15 casos cada 100.000 habitantes (Schelotto et al., 2012; Meny et al., 2019).

En lo que refiere a leptospirosis como enfermedad infecciosa que afecta a la ganadería, existen factores de manejo que favorecen la infección por *Leptospira* spp. Entre estos factores se destacan la compra de ganado infectado, el co-pastoreo con ganado vacuno y ovinos infectados, el acceso del ganado a agua contaminada (arroyos, ríos, inundaciones) (Constable et al., 2017) y el pastoreo de bovinos y ovinos en rastrojos de arroz inundados, favoreciendo la transmisión y supervivencia de la bacteria en el ambiente (Hamond et al., 2019; Levett, 2001; Reis et al., 2017). Los animales jóvenes (terneros y corderos) son más susceptibles a la enfermedad aguda en comparación con animales adultos (Ellis, 2015; Hamond & Riet-Correa, 2023; Yeruham et al., 1997), además son aún más susceptibles aquellos animales que no están vacunados contra leptospirosis (Ellis, 2015). La tasa de morbilidad en bovinos puede variar del 10 al 30% dependiendo de la manifestación clínica de la infección, la tasa de letalidad es baja, alrededor del 5% (Ellis, 2015).

Los serovares Harjo y Pomona son los serovares más predominantes en la población bovina de América del Norte y del Sur, Australia, Nueva Zelanda, Europa y Turquía. Diferentemente, en España el serovar Bratislava es el de mayor prevalencia. En Sudáfrica, el serovar Pomona es el más prevalente y en Turquía el serovar Grippotyphosa (Constable et al., 2017).

Numerosos autores han reportado alta exposición de los rebaños a *Leptospira* spp, basándose en serología (Cheuquepán Valenzuela et al., 2020; Corbellini et al., 2006; Draghi et al., 2011; Easton, 2006; Meyer Zarzar, 2013). Sin embargo, casos de leptospirosis aguda fatal en rumiantes con identificación molecular de la especie involucrada son escasos.

En Uruguay, solo en la región Este, principalmente en las llanuras de la Laguna Merín, fueron diagnosticados más de 120 brotes de leptospirosis en terneros por DILAVE. Se reporta que el diagnóstico fue basado en los hallazgos patológicos y PCR (Dutra, 2019). En Brasil, relevamientos han demostrado que la leptospirosis aguda en bovinos y ovinos es raramente reportada. Existe reporte de por lo menos tres brotes de leptospirosis aguda en terneros de un mes de edad en Santa Vitória do Palmar, Río Grande del Sur. Según Lucena et al. (2010), de 6.706 autopsias realizadas en bovinos, solamente el 0.1% (3 casos) fueron diagnosticados como leptospirosis en el área de influencia del Laboratorio de Patología Veterinaria de la "Universidade Federal de Santa Maria" (UFSM), sin reportarse las técnicas de diagnóstico empleadas. También en el estado del Río Grande do Sul, fue reportado un brote de leptospirosis aguda en terneros mantenidos en un rastrojo de arroz (Reis et al., 2017). Sin embargo, los serovares involucrados en ambos casos no fueron identificados. En Argentina, se

reportó en la provincia de Corrientes, un brote de leptospirosis en terneros de recría con diagnóstico serológico, molecular, patológico y con aislamiento del microorganismo (*L. interrogans* serovar Pomona) (Draghi et al., 2011). En 2017 se reportó un brote de abortos en bovinos en la provincia de Buenos Aires luego de un período de elevadas precipitaciones e inundaciones. Además de confirmar el diagnóstico de leptospirosis mediante serología, se logró el aislamiento de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo por primera vez en Argentina a partir de muestras de orinas de vacas abortadas (Koval et al., 2020).

De los 361 casos de mortalidad en ovinos analizados por el Laboratorio de Patología Veterinaria de la “Universidad Federal de Santa Maria” (UFSM) (Rissi et al., 2010) y de los 523 casos analizados en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la “Universidad Federal do Rio Grande do Sul” (UFRGS) (Cecco et al., 2021), ninguno fue diagnosticado con leptospirosis aguda.

En Uruguay, en 2017 se describe un brote de leptospirosis aguda en corderos, con diagnóstico patológico, pero sin identificación de la especie de *Leptospira* involucrada (Dutra, 2017). Luego de un período de fuertes lluvias e inundaciones se reporta en Uruguay la ocurrencia de dos brotes de leptospirosis aguda en corderos con evidencia clínica, serológica y patológica (ictericia, hemoglobinuria, hepatitis necrotizante aguda con colestasis y nefritis intersticial), identificándose *L. interrogans* Pomona Kennewicki como variante de *Leptospira* involucrada (Hamond et al., 2019). Interesantemente, la variante de *Leptospira* identificada en este brote de leptospirosis aguda en ovinos es una de las variantes más frecuentemente aislada en el ganado vacuno (Zarantonelli et al., 2018), y también aislada de casos de leptospirosis en humanos en nuestro país (Meny et al., 2017). La cuarta especie de *Leptospira* patogénica, *Leptospira kirshneri*, fue identificada como causante de leptospirosis aguda en corderos y terneros no vacunados en la región norte del Uruguay (Machado et al., 2025). Esta especie había sido identificada en humanos (Meny et al., 2017), pero aún no había sido identificada como causa de la enfermedad aguda en rumiantes.

Datos recientes donde se incluye el estudio de leptospirosis como una de las posibles causas infecciosas de aborto en bovinos de leche en Uruguay demuestran la complejidad de comprobar los casos. De los 102 casos de aborto estudiados, solo en 1 caso se detectó *L. interrogans* en hígado de un feto mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación. Sin embargo, no fueron observadas lesiones microscópicas en el feto y otras técnicas de diagnóstico resultaron negativas (serología en líquidos fetales, cultivo, Inmunofluorescencia Directa) (Macías-Rioseco et al., 2020). Recientemente, en un estudio de 100 abortos ovinos, en 15 de 63 fetos estudiados se detectó la presencia de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira* en líquidos fetales, siendo los mismos negativos en la combinación de otras pruebas (qPCR, cultivo, IFD, IHQ) (Dorsch et al., 2022).

4. Signos clínicos

La leptospirosis puede tener curso clínico agudo, subagudo o crónico. Clínicamente, la forma aguda, es grave y frecuentemente fatal, sobre todo para animales jóvenes no vacunados, como terneros y corderos. Se observa fiebre, anemia, disnea, apatía, ictericia, hemoglobinuria y muerte (Salgado et al., 2015; Yeruham et al., 1997). En casos de colecistitis en humanos, manifiestan anorexia, dolor abdominal agudo, fiebre, malestar general, mialgia y artralgia (Davies & Aoyagi, 2017; Guarner et al., 2001).

La forma subaguda, se presenta en vacas lactantes, ocurriendo el “síndrome de caída de la leche” que puede o no estar acompañada de fiebre. Se observa una disminución repentina y marcada de la producción láctea ocurriendo 14-21 días post-infección (Higgins et al., 1980).

Finalmente, la forma crónica ocurre en huéspedes de mantenimiento, animales adultos vacunados o no, que suelen ser asintomáticos. Sin embargo, hembras preñadas pueden presentar aborto, mortinatos y retención de la placenta (Constable et al., 2017).

5. Patología

La leptospirosis es caracterizada patológicamente por lesiones multisistémicas afectando principalmente a los riñones, hígado, corazón, pulmón y menos frecuentemente placenta, meninges, adrenales y vesícula biliar (Cianciolo & Mohr, 2016). Macroscópicamente, las principales alteraciones incluyen, ictericia difusa, hepatomegalia con evidenciación del patrón acinar y friable, colecistitis alitiásica, riñones oscuros con punteado gris y orina color vino tinto (Guarner et al., 2001; Cianciolo & Mohr, 2016; Davies & Aoyagi, 2017; Hamond & Riet-Correa, 2023).

Histológicamente, en el hígado se observa necrosis hepatocelular paracentral y centrolobulillar, infiltrado periportal linfohistiocitario, disociación de cordones hepáticos, hipertrofia de células de Kupffer y colestasis (Pereira et al., 2005; Poonacha et al., 1993; Van der Hoeden, 1953; Hamond & Riet-Correa, 2023). En humanos, está descrita la colecistitis perivascular mononuclear (Davies & Aoyagi, 2017; Guarner et al., 2001).

En los riñones, se produce nefritis tubulointersticial linfoplasmocítica, nefrosis hemoglobinúrica, cilindros intratubulares granulares, celulares o hialinos, glomerulitis y periglomerulitis linfoplasmocítica y menos frecuentemente glomerulonefritis membranoproliferativa o exudativa (Ajayi et al., 2020; Hilbe et al., 2023). Además, está descrita la miocarditis perivascular linfoplasmocitaria y neumonía intersticial no supurativa con áreas de hemorragia (Poonacha et al., 1993; Seguel et al., 2017).

Otras lesiones incluyen, meningitis linfocítica (Merwick et al., 2008) y adrenalitis necrótica linfoplasmocitaria (Guarner et al., 2008).

En casos de aborto, se observa placentitis necrótica linfoplasmocitaria con vasculitis, trombosis e hiperplasia adenomatosa quística de epitelio alantoideo (Aycardi et al., 1982; Smyth et al., 1999; Velineni et al., 2016). Las lesiones se caracterizan por disociación hepatocelular, infiltración leucocitaria mixta de las tríadas portales, nefritis supurativa y no supurativa, hemorragias pulmonares, neumonía y miocarditis mononuclear (Poonacha et al., 1993).

6. Diagnóstico

Existen diversos métodos de diagnóstico que pueden ser utilizados conforme disponibilidad y condiciones de las muestras. Generalmente, en casos agudos después de transcurridas algunas horas desde la muerte el uso de dichas técnicas presenta resultados variables. Para identificar la especie y serovares de leptospiras infectantes, es necesario recurrir al cultivo microbiológico mediante uso de medios de cultivo específicos para *Leptospira* spp., técnicas moleculares y disponibilidad de laboratorios especializados. Por otro lado, las técnicas empleadas en tejido fijado son suficientemente concluyentes para establecer el diagnóstico y determinar la distribución del agente en los tejidos.

6.1 Diagnóstico serológico mediante prueba de aglutinación microscópica

La prueba de aglutinación microscópica (MAT, por sus siglas en inglés “Micro Agglutination Test”) es el método oro recomendado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) y también el más utilizado a nivel mundial en el diagnóstico de esta enfermedad (OIE, 2021; Van de Maele et al., 2008). Este método se basa en la determinación de títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* aglutinantes, utilizando como antígenos cultivos de leptospiras vivas, que representan los serogrupos y serovares circulantes del área/región geográfica donde el animal se infectó. Debido a que este método no permite diferenciar anticuerpos inducidos por infecciones pasadas y/o inmunizaciones con vacunas anti-leptospira, el diagnóstico de la infección aguda se confirma cuando las muestras pareadas del mismo animal muestran un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos aglutinantes (OIE 2021; Haake & Levett, 2015).

6.2 Examen microscópico directo

Se utiliza un microscopio de campo oscuro que permite visualizar las leptospiras de fluidos corporales, principalmente en orina, sangre o en tejidos. Sin embargo, presenta baja sensibilidad y especificidad, insume mucho tiempo, además es necesario de un operador experimentado (Agudelo-Flórez et al., 2008).

6.3 Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico, el aislamiento y posterior identificación de la bacteria, proporcionan una sólida prueba diagnóstica. Para ello se utiliza el medio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) que es el medio líquido más utilizado para cultivar leptospiras. Se pueden sembrar muestras de sangre, orina, humor acuoso, leche y diversos órganos (Ellis, 2015). Este método presenta alta especificidad y baja sensibilidad, dependiendo de la muestra y del estado de infección que se encuentra el animal al momento del muestreo. Las leptospiras patógenas son de crecimiento lento, se deben incubar a temperaturas de 28 a 30°C y realizar seguimiento de estos observándose el cultivo en microscopio de campo oscuro, al menos una vez por semana, para detectar la presencia de la bacteria, de todas maneras, debe continuar su seguimiento hasta por lo menos 13 a 26 semanas (Arboleda et al., 2023). Si bien es un método que aporta resultados muy valiosos con fines epidemiológicos, no es un método de diagnóstico de rutina por el tiempo que lleva evidenciar un crecimiento positivo.

6.4 Técnicas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y de alta sensibilidad, está enfocada en la detección directa de secuencias de ADN de leptospiras patógenas en muestras biológicas (Ahmed et al., 2009). Permite detectar niveles bajos en número de bacterias (Azizi et al., 2014). La PCR es un método más rápido que las pruebas serológicas y cultivos microbiológicos, jugando un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis. Uno de los bancos moleculares más frecuentemente utilizado es el gen *lipL32* que codifica la lipoproteína *lipL32* altamente conservada en la membrana externa de las especies patógenas de *Leptospira*. Este gen sólo se ha descrito en las especies patógenas, permitiendo la detección selectiva (Podgoršek et al., 2020). Si bien este método es rápido, sensible y específico, presenta como desventaja que no puede predecir el serovar infectante (Picardeau, 2013).

6.5 Tinción argéntica

Esta técnica es útil para muestras fijadas en formalina (Szeredi & Haake, 2006). La coloración Warthin-Starry permite detectar leptospiras en la superficie apical del epitelio y en los lúmenes de los túbulos renales, dispuestas individualmente o formando agregados, enteras o fragmentadas (Hr et al., 1961; Marshall, 1974). Como desventaja, presenta baja sensibilidad, requiere muestras de tejidos en buen estado de conservación para distinguir correctamente la estructura de la bacteria y búsqueda minuciosa de los preparados. Además, existen algunas dificultades en interpretación en este método porque las fibras de reticulina se tiñen con Warthin-Starry y los fragmentos bacterianos no son reconocibles, especialmente si pocos organismos están presentes (Szeredi & Haake, 2006).

6.6 Inmunohistoquímica

La técnica permite revelar la presencia de antígenos bacterianos y ubicarlos histológicamente, permitiendo co-localizar la bacteria con la lesión en el tejido en estudio (Delgado et al., 2007). Se utiliza un antisuero policlonal de conejo anti-*Leptospira* que permite detectar leptospiras intactas o fragmentadas (Wilson et al., 2021). Como desventaja la inmunohistoquímica generalmente sólo está disponible en laboratorios especializados y puede resultar falso negativo. Puede ser útil para confirmar casos en los que no se pudo realizar técnicas moleculares o serológicas.

7. Control y profilaxis

En casos agudos el tratamiento correspondiente es estreptomicina o dihidroestreptomicina a una dosis de 12mg/kg cada 12 horas, durante 5 días. Se recomienda una única dosis de estreptomicina (25 mg/kg) combinada con vacunación contra leptospirosis en el caso de que se haya producido el aborto (Hamond & Riet-Correa, 2023). La terapéutica presentada tiene limitaciones de aplicación en virtud del curso clínico agudo fatal.

Profilácticamente, se recomienda el uso de vacunas. En Uruguay, actualmente las vacunas comerciales contra la leptospirosis están disponibles, todas ellas son polivalentes: Bovisan® Lepto 8 (Virbac, Uruguay), contiene ocho antígenos (*L. interrogans* serovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Canicola, Wolffi, Grippotyphosa y Tarassovi, y *L. borgpetersenii* sv Hardjo); Leptoferm-5® (Zoetis, EE. UU.) Zoetis, con cinco antígenos (*L. interrogans* serovares Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona); Leptospirosis® (Centro Diagnóstico Veterinario S.A, Argentina) contiene 8 antígenos (*L. interrogans* serovares Pomona, Wolffi, Hardjo, Canicola e Icterohaemorrhagiae; *L. kirschneri* sv Grippotyphosa, *L. borgpetersenii* serovares Tarassovi y Castellonis); Providean Lepto 8® (FATRO, Uruguay), con 8 antígenos (*L. interrogans* serovares Pomona, Canicola, Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae y Bratislava, *L. borgpetersenii* serovar Tarassovi y *L.kirschneri* serovar Grippotyphosa); y Vac-sules Lepto 11® (Microsules, Uruguay), que declara la inclusión de once antígenos diferentes, sin especificar la especie de los mismos (serovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Hardjo, Canicola, Wolffi, Grippotyphosa, Tarassovi, Bataviae y Pyrogenes).

Sin embargo, se observó que la mayoría de los serovares que se aislaron de bovinos en Uruguay, no están incluidos en las vacunas disponibles comercialmente a excepción de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo y *L. interrogans* serovar Canicola, hasta donde se conoce. El serovar Kennewicki del serogrupo Pomona (*L. interrogans*), ni ninguno de los serogrupos de *L. noguchii* identificados (Zarantonelli et al., 2018), están incluidos en formulaciones de bacterinas de las diferentes compañías que producen y comercializan vacunas para uso en bovinos en América del Sur. Por lo expuesto, se hace necesario conocer la infectividad y patogenicidad de estos serovares autóctonos aislados.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leptospirosis en bovinos ha sido ampliamente estudiada en varias regiones del mundo, principalmente, por su perfil zoonótico y por los impactos que provoca en la producción animal. La enfermedad induce trastornos clínicos y reproductivos que pueden estar impactando negativamente a los rodeos.

En Uruguay, un equipo interinstitucional y multidisciplinario de investigadores de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), de la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), de la Universidad de la República (UdelaR) y del Institut Pasteur de Montevideo, llevó adelante un proyecto multicéntrico que permitió generar conocimiento acerca de cuáles son las variantes patógenas de *Leptospira* spp. que infectan a los bovinos en el país (Zarantonelli et al., 2018). A partir del cultivo microbiológico de muestras de bovinos infectados se logró un banco de cepas que fueron caracterizadas mediante la combinación de métodos de tipificación serológicos y moleculares. Las variantes de leptospiras aisladas de bovinos incluyeron *L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki, *L. interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola, *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo, y *L. noguchii* serogrupos Australis, Autumnalis y Pyrogenes, siendo Autumnalis el serogrupo predominante. A excepción de la variante *L. interrogans* sv Canicola y *L. borgpetersenii* sv Hardjo, el resto de las variantes de leptospiras aisladas de bovinos no están incluidas en las formulaciones de vacunas de uso veterinario en bovinos en Uruguay.

Las vacunas anti-*Leptospira* son bacterinas, es decir que incluyen en su formulación bacterias enteras inactivadas. La OMSA es muy clara en lo que refiere a la producción de vacunas de uso en especies animales: “*La inmunidad inducida mediante la vacunación es en gran medida específica de serotipo. Una vacuna debe formularse para su uso en una especie concreta de animal de una región geográfica concreta. Solo debe contener aquellos serotipos – y preferentemente aquellos genotipos – que causen problemas en la especie animal, o que se transmitan de una especie animal a otra en la región*” (OIE, 2021). Cabe plantearse entonces la necesidad de profundizar el estudio de los aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. obtenidos de bovinos en Uruguay como potenciales antígenos de interés para incluir en nuevas formulaciones de vacunas de uso veterinario para la protección de la enfermedad en los rodeos uruguayos.

Este trabajo de tesis propone el estudio de la capacidad infectiva y patogénica de cuatro variantes de *Leptospira* spp. aisladas de bovinos en Uruguay.

9. HIPÓTESIS

Las variantes autóctonas *Leptospira noguchii* sg Autumnalis, *Leptospira interrogans* Pomona Kennewicki, *Leptospira borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *Leptospira interrogans* Canicola Canicola pueden infectar y causar enfermedad clínica y lesiones en bovinos desafiados experimentalmente.

10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de infección de *Leptospira noguchii* sg Autumnalis, *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. interrogans* Canicola Canicola en un modelo experimental bovino.

10.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de infección a través de mucosas de *Leptospira noguchii* sg Autumnalis, *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. interrogans* Canicola Canicola.
- Estudiar el desarrollo de signos clínicos post-infección.
- Estudiar la cinética de la infección bacteriana mediante detección por qPCR de leptospiras en sangre (leptospiremia) y orina (leptospiruria).
- Evaluar la presencia de la *Leptospiras* en órganos blandos mediante qPCR y cultivo microbiológico.
- Caracterizar los hallazgos macroscópicos y microscópicos al punto final del experimento.
- Evaluar la capacidad inmunogénica post-infección de las cuatro variantes de *Leptospira* estudiadas mediante determinación de títulos de anticuerpos aglutinantes por MAT.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Diseño experimental

Se seleccionaron para evaluación de la infección por mucosas y determinación del cuadro clínico y lesional en un modelo bovino de infección cuatro variantes de *Leptospira* spp. aisladas de bovinos en Uruguay. Dos de estas variantes seleccionadas (*L. interrogans* sg Pomona sv Kennewicki, *L. borgpetersenii* sg Sejroe sv Hardjo), son representativas de las variantes más frecuentemente aisladas de bovinos. También se seleccionaron para estudio el serogrupo más frecuente de la especie *noguchii* (*Leptospira noguchii* sg Autumnalis), y la variante *L. interrogans* sg Canicola sv Canicola, por ser esta una variante aislada de un caso agudo en bovinos y por ser junto con la variante Pomona Kennewicky, variantes de *Leptospira* descritas en casos de leptospirosis en humanos en Uruguay (Meny et al., 2017; Zarantonelli et al., 2018). El protocolo de estudio en el modelo bovino fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Experimentación de INIA (CEUA), inscrita ante la Comisión Nacional de Experimentación Animal - INIA (Protocolo #2018.2b). La obtención de las muestras de orina y sangre de bovinos a campo y durante el ensayo experimental fueron realizados por veterinarios profesionales, en cumplimiento de las recomendaciones internacionales de bienestar animal, con aprobación otorgada por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Experimentación CEUA, DILAVE, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca MGAP, Uruguay, según ley nacional #18.61.

11.2 Selección de animales sin evidencia de exposición a la infección por *Leptospira* spp.

Se seleccionó para el estudio el rodeo bovino de la Unidad Experimental INIA La Magnolia (31° 42' 36.648" S 55° 49' 34.716" W), por no presentar casuística de abortos en los últimos doce meses. Se seleccionaron madres/terneras de dos meses de edad, de raza Braford, sin histórico de vacunación contra leptospira para un primer muestreo ($n=48$ pares); se tomaron muestras de suero para realizar análisis serológico, test de microaglutinación (MAT) y muestras de orina para análisis molecular (qPCR). Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur + INIA en el Institut Pasteur de Montevideo. Allí se analizó la reactividad de los sueros de madres y terneras contra 15 serogrupos de *Leptospira*, incluyendo cepas de referencia y todas las variantes de *Leptospira* autóctonas aisladas de bovinos en Uruguay, y utilizando una dilución 1/50 como punto de corte. Se realizó una extracción de ADN a partir de 15 mL de orina para la detección de ADN de leptospirosis patógenas mediante amplificación del gen *lipL32* mediante un protocolo validado de PCR cuantitativa en tiempo real con un límite de detección de 10 genomas copia de *Leptospira* spp. (Nieves, 2018). Se preseleccionaron un grupo de terneras ($n=36$) con resultados negativos para ambas pruebas, tanto en las terneras como en sus respectivas madres. A los 15 días, se obtuvo una nueva muestra de suero y de

orina de las 36 terneras preseleccionadas y se repitió el mismo procedimiento de análisis en sueros y orinas. Las 36 terneras mostraron ser seronegativas para los 15 serogrupos analizados y no se detectó ADN de *Leptospira* en ninguna de las muestras de orina.

Posteriormente a las terneras, se les adaptó a alimentación de concentrados en comederos y se les aplicó un plan sanitario para la prevención de enfermedades respiratorias, diarreas Neumosan® V4J5 (Virbac, Uruguay) clostridiales Ultrachoice® 8 (Zoetis, EE. UU), y queratoconjuntivitis Piliguard® (MSD, EE.UU), y se trataron para helmintos gastrointestinales Ripsol® (Magnis, Uruguay), Se revacunaron a los 21 días. A los 20 días de la segunda vacunación se realizó destete definitivo.

Finalmente se seleccionaron para el ensayo de infección experimental 20 terneras sanas de tres meses de edad, sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis, sin evidencia de infección por *Leptospira* spp (2 resultados de serología no reactivas al MAT y 2 resultados de qPCR negativa en orina para la detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira*), con un peso promedio de 100 kg cada una y de temperamento dócil. Las mismas fueron divididas al azar en cinco grupos de $n=4$ terneras por grupo.

11.3 Inoculación con variantes autóctonas de *Leptospira* spp. a través de mucosas

El ensayo experimental se llevó a cabo en boxes ubicados en la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Tacuarembó (31° 44' 10.871" S 55° 58' 37.146" W). Los mismos se encuentran en una zona aislada de otros animales y con ingreso restringido exclusivamente al personal involucrado en el ensayo. El personal autorizado a trabajar con los animales durante la realización del protocolo experimental utilizó indumentaria adecuada y elementos de protección personal cumpliendo un protocolo de bioseguridad.

Las 20 terneras seleccionadas para el ensayo fueron transportadas desde el campo experimental hacia los boxes una semana antes del inicio del ensayo con el objetivo de aclimatación de los animales a las condiciones de alojamiento en los boxes. Durante todo el período del ensayo, los animales recibieron comida y agua *ad libitum* y se realizó limpieza y desinfección con hipoclorito de sodio (100 g/l cloro activo) de los boxes diariamente.

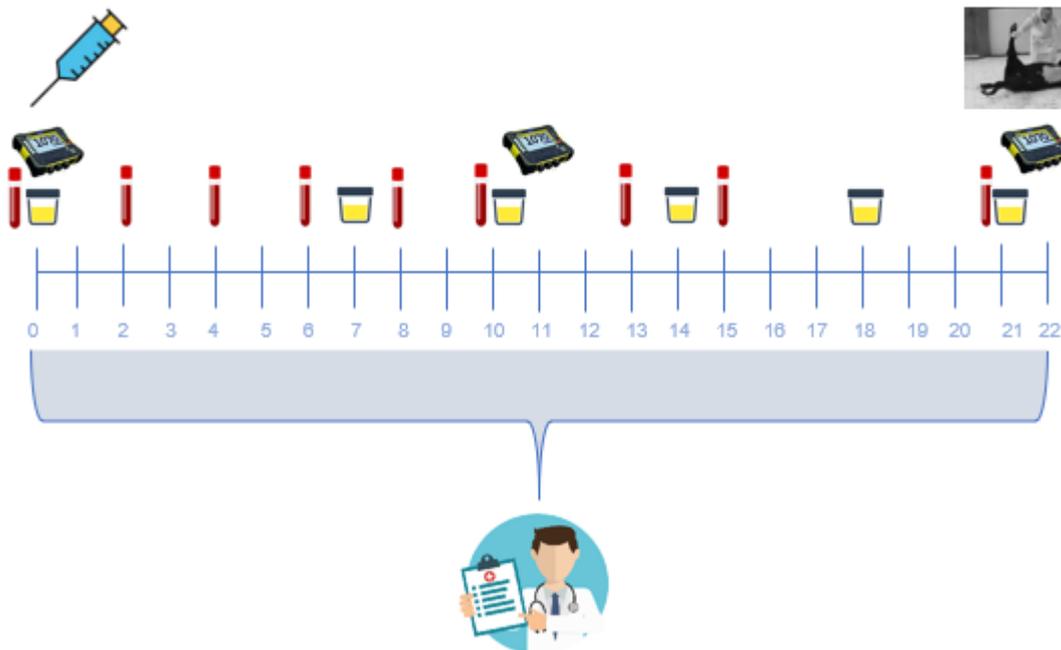
Se definieron cinco grupos experimentales con $n=4$ animales por grupo según la cepa utilizada para el desafío infectivo:

- Grupo A: Desafío con *Leptospira noguchii* sg Autumnalis (aislamiento IP1611035)
- Grupo B: Desafío con *L. interrogans* Pomona Kennewicki (aislamiento IP1708039)

- Grupo C: Desafío con *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo (aislamiento IP1711048)
- Grupo D: Desafío con *L. interrogans* Canicola Canicola (aislamiento IP1711049)
- Grupo E: Animales control, desafiados con buffer fosfato salino estéril (PBS)

Para el desafío se utilizaron cultivos de leptospiras en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) en fase exponencial de crecimiento. Para cada una de las cepas, se cuantificó el número de bacterias en fase exponencial de crecimiento mediante recuento en cámara de Petroff-Housser, evidenciadas como bacterias móviles y refringentes al microscopio de campo oscuro (MCO). Luego de centrifugar a 8000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el pellet bacteriano con un volumen necesario de PBS 1X estéril para lograr una suspensión bacteriana de 1×10^8 leptospiras/mL mediante recuento en cámara de Petroff-Housser como se describió anteriormente. El día del desafío (D0), se realizaron 3 inoculaciones con intervalo de dos horas cada una (08:00am-10:00am-12:00am), administrando 500 μ l de la suspensión bacteriana por vía conjuntival y 500 μ l de la suspensión bacteriana por vía intranasal. Así, cada animal recibió un inóculo bacteriano de 3×10^8 leptospiras (Zarantonelli et al., 2018). El grupo control fue inoculado de igual manera mediante administración del mismo volumen de PBS 1x estéril.

11.4 Cronograma



- Día cero (D0): se realizaron toma de muestra de sangre, suero y orina. Se inocularon a cada grupo infectante su variante correspondiente por la mañana; Grupo A: *Leptospira noguchii* sg Autumnalis. Grupo B: *L. interrogans* Pomona Kennewicki. Grupo C: *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo. Grupo D: *L. interrogans* Canicola Canicola.

- D2-D4-D6-D8 p.i: se realizaron toma de sangre para ser sembradas en EMJH para cultivo-aislamiento y para análisis molecular qPCR del gen *lipL32*.
- D6-D8-D10-D13-D15-D21 p.i: se realizaron las tomas de suero para realización de MAT.
- D7-D10-D14-D18-D21 p.i: tomas de orinas para ser sembradas en medio EMJH para cultivo-aislamiento y para análisis molecular qPCR.
- D 21 p.i: se realizó autopsia de los cuatro grupos infectantes.
- D 22 p.i: autopsia de las cuatro terneras del grupo control. Se les realizó eutanasia (Acepromacina 10mg/kg, Xilacina 0.04-0.1mg/kg, Tiopental 80mg/kg).

11.5 Seguimiento de parámetros clínicos

Durante los 21 días de duración del experimento se llevó a cabo un examen físico diario individual, registrando parámetros de comportamiento, frecuencia cardíaca (Valor de referencia (VR) 40-80 latidos/min), frecuencia respiratoria (VR 12-36 respiraciones/min), temperatura rectal (VR 38-39°C), coloración de las mucosas, palpación de nódulos linfáticos y apetito de acuerdo con Smith et al., (2019). La evaluación del peso corporal fue realizada en el día D0 previo a la infección, y a los 11 y 21 días post-infección (D11 y D21).

11.6 Obtención de muestras biológicas para seguimiento de la cinética de infección por *Leptospira* spp.

Para la recolección individual de sangre se realizó venopunción yugular, utilizando aguja estéril calibre 20 de 1 pulgada y tubos de 5 ml sin anticoagulante (BD Vacutainer®) y tubos de 5 ml con anticoagulante EDTA K2 (BD Vacutainer®). Las muestras de sangre sin anticoagulantes se dejaron a temperatura ambiente durante una hora para obtención de muestras de suero. Luego de separación del coágulo mediante centrifugación a 1.500 xg durante 15 minutos, los sueros se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis.

Para la recolección individual de muestras de orina se administró 1 ml de diurético (~150 mg de furosemida, Furo R®, Ripoll) por vía intramuscular. Se realizó higiene completa de los órganos genitales con algodón y etanol al 70%. Una vez inducida la micción, se colectaron aproximadamente 60 ml de la segunda fracción de orina en recipientes estériles (Bioset, Medicplast). Las muestras de orina fueron transportadas al laboratorio y procesadas de manera inmediata para cultivo microbiológico en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y para la extracción de ADN (descrito en punto 11.8).

11.7 Determinación de anticuerpos anti-*Leptospira* mediante test de microaglutinación (MAT)

Para el análisis de los sueros de las duplas madres/terneras durante la etapa de selección de animales para el ensayo, se enfrentaron las muestras de suero a un panel de 15 antígenos. Dentro del mismo se incluyeron cepas de referencia *L. borgpetersenii* sg Ballum sv Castellonis, *L. kirschneri* sg Grippytyphosa sv Grippytyphosa, *L. interrogans* sg Icterohaemorrhagiae sv Copenhageni, *L. interrogans* sg Icterohaemorrhagiae sv Icterohaemorrhagiae *L. borgpetersenii* sg Tarassovi sv Tarassovi, *L. interrogans* sg Sejroe sv Hardjo, *L. interrogans* sg Sejroe sv Wolfii, *L. interrogans* sg Pomona sv Pomona, y aislados autóctonos de bovinos (*L. borgpetersenii* sg Sejroe sv Hardjo, *L. interrogans* sg Pomona sv Kennewicki, *L. interrogans* sg Canicola sv Canicola, *L. noguchii* sg Pyrogenes, *L. noguchii* sg Australis, *L. noguchii* sg Autumnalis y *L. noguchii* no aglutinable. Partiendo de una dilución inicial de 1/50 de cada suero en solución salina tamponada, se realizaron diluciones sucesivas al medio en placa de 96 pocillos. Luego se agregaron las suspensiones antigénicas de leptospiros vivas, y luego de una incubación de 2 horas a 30°C se determinó el título aglutinante mediante lectura de aglutinación en el microscopio de campo oscuro.

Para el análisis de inmunogenicidad de las distintas cepas de *Leptospira* spp. usadas en el ensayo de infección, se determinó el título de anticuerpos aglutinantes en los sueros de los animales infectados experimentalmente utilizando como antígeno solamente la cepa homóloga utilizada en cada grupo de ensayo. Los sueros de los animales del grupo control fueron enfrentados contra las cuatro variantes de *Leptospira* spp. usadas para el desafío de los grupos A, B, C y D. Se siguió el procedimiento mencionado anteriormente usando como punto de corte una dilución 1/25 (primera dilución de ensayo en placa).

11.8 Detección de ADN de *Leptospira* spp. mediante amplificación del gen *lipL32* por PCR en tiempo real

Para la extracción de ADN se procesaron 15 mL de orina y 1 mL de humor vítreo, este último tomado al momento de la autopsia. Luego de un paso de centrifugación a 10.000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, se realizó un lavado del pellet con PBS 1X estéril pH 7.4. Se repitió el paso de centrifugación y se resuspendió el pellet en 100 ul de PBS 1X estéril pH 7.4, se pasó a eppendorf de 1.5ml y se congeló en freezer -20°C hasta la extracción del ADN. Para las muestras de sangre, se conservaron a -80°C 200 ul de sangre entera en eppendorf de 1,5 ml estériles hasta su procesamiento para extracción de ADN.

Al momento de la autopsia (21 días p.i), se tomaron muestras de pulmón, corazón, hígado, bazo, útero y riñón para detección de ADN de *Leptospira* spp. Luego de fraccionar con bisturí estéril en placa de Petri estéril bajo cabina de bioseguridad, 50 mg de cada órgano se colocó en eppendorf de 2ml, se congeló rápidamente en

nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento para extracción de ADN.

Para la extracción y purificación de ADN a partir de las distintas muestras biológicas colectadas tanto durante la selección de las terneras (orina), como durante el experimento de desafío con las 4 cepas de *Leptospira* spp. (sangre entera, orina, humor vítreo y muestras de los tejidos mencionados anteriormente), se utilizó el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo protocolos validados en el Laboratorio de la Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI) (Nieves, 2018; Zarantonelli et al., 2018). Se evaluó luego la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en las distintas matrices biológicas aplicando un protocolo validado de PCR en tiempo real (cinética de amplificación con química SYBR Green) con un límite inferior de cuantificación equivalente a 10 genomas bacterianos (Nieves, 2018).

11.9 Detección de *Leptospira* spp. mediante cultivo microbiológico

Con el objetivo de detectar leptospiras viables en las distintas muestras biológicas colectadas durante el ensayo se realizó inoculación de las mismas para cultivo microbiológico en medio EMJH suplementado con 5'-fluorouracilo (5'FU) como agente selectivo. Se inocularon 200 µL de muestras de sangre y de humor vítreo y 100 µL de orina en 5 mL de EMJH con 5'FU no más allá de las dos horas post-colecta de las muestras en laboratorio DILAVE Tacuarembó. A partir de una fracción de hígado, riñón y útero se realizó un homogenato de cada órgano en tubo eppendorf con 500 µL de PBS 1X pH 7.4 estéril. Los homogenatos se incubaron 1h a 30°C y posteriormente 300 µL de sobrenadante fueron inoculados en 5 ml de medio EMJH con 5'FU.

Los tubos de EMJH con 5'FU inoculados con las diferentes muestras se incubaron en la estufa a 30°C. El crecimiento bacteriano se monitoreó semanalmente por observación en microscopio de campo oscuro. En los casos donde se evidenció crecimiento de formas compatibles con leptospiras, se procedió al aislamiento, identificación y conservación de la cepa aislada según metodología de rutina en el laboratorio de UMPI (Zarantonelli et al., 2018).

11.10 Autopsia e histopatología

Durante la autopsia se recolectaron fragmentos de riñón, hígado, vesícula biliar, útero, bazo, corazón, pulmón, morro, párpado, oreja, lengua, músculo esquelético, pre-estómagos, abomaso, intestinos, glándulas adrenales, linfonódulos, vejiga, ovarios, timo, tiroides, encéfalo y médula espinal cervical, hipófisis, *rete mirabilis* y ganglio trigémino. Los fragmentos de tejidos fueron fijados en formol al 10 % bufferado (pH 7.2), durante 48 horas. El procesamiento fue realizado en el Laboratorio de Histología de la PSA en INIA Tacuarembó. Se realizó reducción y los fragmentos fueron acondicionados en cassettes, procesados rutinariamente utilizando el Histo-Tek VP1 (Sakura, Japón), y emblocados en parafina utilizando Tissue-

Embedding Console System (Sakura, Japón). Fueron realizados cortes de 4 μ m utilizándose el Accu-Cut SRM 200 (Sakura, Japón). Los cortes fueron sometidos a tinción de Hematoxilina y Eosina (Tissue-Tek Prima Plus, Sakura, Japón). Finalmente, los preparados histológicos fueron analizados utilizando microscopio óptico (BX53 Upright Microscope, Olympus, USA).

La tinción argéntica (Warthin-Starry silver plating kit modified, Sigma-Aldrich, USA), fue empleada de acuerdo con las especificaciones del proveedor en riñones incluidos en parafina para visualización de las leptospiras, en el cual se utilizó control positivo de Wilson et al. (2021).

11.11 Inmunohistoquímica

Se seleccionó un animal de cada grupo infectante (A2, B7, C12 y D16) y un animal del grupo control (E17). Para la selección de los mismos, se tuvo en cuenta cuales eran los que presentaban lesiones microscópicas más severas a nivel renal, y así poder demostrar a la bacteria intralesionalmente con la inmunomarcación.

La técnica se realizó en el Laboratorio de Histología de la PSA en INIA La Estanzuela siguiendo un procedimiento operativo estandarizado, provisto gentilmente por la histotecnóloga Karen Sverlow, del laboratorio de histología del “California Animal Health and Food Safety (CAHFS) Laboratory System”, de la “University of California, Davis”. Resumidamente, las secciones de tejidos fueron desparafinadas y rehidratadas, y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos. No se aplicó ningún método de recuperación antigénica. Como anticuerpo primario se utilizó un suero de conejo disponible comercialmente (*Leptospira* multivalent fluorescent antibody conjugate, #LEP-FAC, National Veterinary Services Laboratories -NVSL-, United States Department of Agriculture -USDA-, Ames, Iowa) a una dilución de 1:1000. Como anticuerpo secundario/sistema de detección se usó suero anti-conejo producido en cabra, conjugado con un polímero marcado con peroxidasa de rábano (EnVision+ System HRP, Dako, #K4003, Carpinteria, California), y la solución de cromógeno/sustrato con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Dako, #K3464, CA, California, USA).

Como control positivo se usó riñón de un ratón inoculado experimentalmente con *Leptospira* spp. en el Instituto Pasteur de Montevideo, cedido gentilmente por la Dra. Leticia Zarantonelli. Se utilizaron como controles negativos: secciones seriadas del este mismo riñón y de cada uno de los tejidos analizados, a las que no se les aplicó anticuerpo primario sino suero normal de conejo (Biocare Medical #NC499H, Pacheco, California). Se usó hematoxilina como contracoloración.

12. RESULTADOS

12.1 Cuadro clínico

Ninguna de las variantes ocasionó alteraciones en el apetito, frecuencia respiratoria (10-30 rpm) y cardíaca (100-140 lpm), temperatura rectal (38.5-39°C) o en la coloración de las mucosas de las terneras en los 21 días p.i.

12.2 Cinética de la infección por *Leptospira* spp. en terneras infectadas a través de mucosas

Con el objetivo de conocer la capacidad infectiva a través de mucosas de las cuatro variantes de *Leptospira* spp. estudiadas, se aplicaron métodos directos de detección de la bacteria (qPCR y cultivo microbiológico) en diferentes muestras de tejidos y matrices biológicas. En la fase de leptospiremia (D1 a D7 post-infección), se detectó la presencia de *L. interrogans* Pomona Kennewicki con desarrollo de cultivo positivo en muestras de sangre colectadas a las 24 horas post-infección en dos de los cuatro animales infectados con esta variante (Tabla 1). Si bien ninguna de las otras variantes de *Leptospira* spp. fue detectada en la fase de leptospiremia, a partir del día 13 post-infección se observó la excreción de leptospiras en orina en 1 de los 4 animales infectados con las variantes *L. noguchii* y *L. borgpetersenii* y en 2 de los 4 animales infectados con *L. interrogans* sg Canicola. A los 21 días post-infección, en los cuatro grupos de animales infectados se observó al menos 1 animal en el que se detectó al menos un episodio de leptospiruria positiva (Tabla 1). Además, se aislaron bacterias viables a partir de muestras de orina de animales infectados con las variantes de *L. interrogans* sg Pomona y sg Canicola; y *L. borgpetersenii* sg Sejroe. Estos resultados evidencian la capacidad infectiva a través de mucosas de las cuatro variantes de *Leptospira* spp. estudiadas en terneras jóvenes de tres meses de edad.

Tabla 1. Cinética de leptospiremia y leptospiruria en bovinos infectados por mucosa nasal y conjuntival con variantes autóctonas de *Leptospira* spp.

Identificación Grupo/ Animal	qPCR <i>lipL32</i> y/o cultivo microbiológico									
	D0*		D1		D2		D7		D13	D17
	San gre	Orina	San gre	Orina	San gre	Orina	San gre	Orina	Orina	Orina
GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis										
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO B <i>L. interrogans</i> sg Pomona sv Kennewicki										
B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> sg Sejroe sv Hardjo										
C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GRUPO D <i>L. interrogans</i> sg Canicola sv Canicola										
D13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
GRUPO CONTROL (E)										
E17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D: días post-infección

*Muestras colectadas antes de la infección con *Leptospira* spp

12.3 Detección de *Leptospiras* patógenas en órganos blanco

Evaluamos luego la presencia de las distintas variantes de leptospiras patógenas en diferentes tejidos y órganos obtenidos al momento de la eutanasia de los animales en el punto final del experimento (21 días post-infección). No se detectó la presencia de leptospiras en las muestras de bazo, corazón, pulmón y humor vítreo en ninguno de los animales infectados (Tabla 2). En las muestras de hígado, se detectó la presencia de leptospiras infectivas en 1 de 4 terneras infectadas con *L. noguchii* Autumnalis, en 1 de 4 terneras infectadas con *L. interrogans* Pomona Kennewicki, en 1 de 4 terneras infectadas con *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y en 2 de 4 terneras infectadas con *L. interrogans* Canicola Canicola (Tabla 2). A nivel del tejido renal, se detectó la presencia de leptospiras patógenas en al menos un animal de cada grupo experimental, evidenciando la llegada de las cuatro variantes a este órgano blanco (Tabla 2). Por último, un hallazgo interesante fue la detección de leptospiras infectivas en el tracto reproductivo (útero) de una ternera infectada con *L. noguchii* Autumnalis (Tabla 2).

En suma, las cuatro variantes de leptospiras estudiadas en este trabajo fueron capaces de infectar a través de mucosas, de diseminarse por vía hematológica alcanzando diferentes órganos, incluyendo la colonización del tejido renal, órgano blanco de especies patógenas del género *Leptospira* spp.

Tabla 2. Detección de *Leptospira* spp. en órganos de bovinos infectados experimentalmente a los 21 días p.i

Identificación Grupo/Animal	Tejido/matriz biológica						
	Bazo *	Corazón *	Pulmón *	Hígado**	Humor Vítreo**	Útero* *	Riñón**
GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis							
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	+	-
A3	-	-	-	+	-	-	+
A4	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO B <i>L. interrogans</i> sg Pomona sv Kennewicki							
B5	-	-	-	+	-	-	-
B6	-	-	-	-	-	-	+
B7	-	-	-	-	-	-	+
B8	-	-	-	-	-	-	+
GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> sg Sejroe sv Hardjo							
C9	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	+	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	+
GRUPO D <i>L. interrogans</i> sg Canicola sv Canicola							
D13	-	-	-	+	-	-	-
D14	-	-	-	-	-	-	-
D15	-	-	-	-	-	-	-
D16	-	-	-	+	-	-	+
GRUPO CONTROL (E)							
E17	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-
E19	-	-	-	-	-	-	-
E20	-	-	-	-	-	-	-

* Muestras analizadas por qPCR

**Muestras analizadas por qPCR y cultivo microbiológico

12.4 Estudio de la capacidad inmunogénica post-infección mediante determinación de títulos de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira*

En el grupo A, se obtuvieron títulos de anticuerpos a partir del día 10 en adelante, llegando a títulos de 3200 al día 21 (Tabla 3). El grupo B, al día 6, ya marcó títulos de 25, se mantuvo en los tres muestreos consecutivos, al día 15 aumentó al doble y en el día 21 volvió a títulos de 25 (Tabla 3), eso indica que el animal controló la infección a través de su sistema inmune. En el grupo C, al igual que el grupo B, al día 6 p.i se obtuvieron títulos de 25 y siguió aumentando hasta tres veces más (200 en el día 21 p.i) (Tabla 3). En el caso del grupo D, el primer título se obtuvo a partir del día 8 p.i, alcanzando títulos de 3200 al día 21 p.i., al igual que el grupo A. En el grupo control (E), no se obtuvieron títulos de anticuerpos en ninguna de las muestras de suero analizadas en la totalidad de las tomas (Tabla 3).

Tabla 3. Cinética de títulos de anticuerpos aglutinantes anti-*leptospira* en terneras infectadas por cuatro variantes de *Leptospira* spp. autóctonas evaluadas por test de microaglutinación (MAT)

Identificación Grupo/Animal	Día post-infección						
	0	6	8	10	13	15	21
GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis							
A1	NR	NR	NR	NR	100	1600	3200
A2	NR	NR	NR	25	3200	3200	3200
A3	NR	NR	NR	800	1600	1600	800
A4	NR	NR	NR	25	NR	100	NR
GRUPO B <i>L. interrogans</i> sg Pomona sv Kennewicki							
B5	NR	25	25	25	25	NR	NR
B6	NR	25	25	25	25	NR	25
B7	NR	25	25	25	25	50	50
B8	NR	25	25	25	25	NR	25
GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> sg Sejroe sv Hardjo							
C9	NR	NR	25	25	50	50	200
C10	NR	NR	NR	NR	100	100	200
C11	NR	NR	NR	NR	50	100	NR
C12	NR	25	25	25	100	50	100
GRUPO D <i>L. interrogans</i> sg Canicola sv Canicola							
D13	NR	NR	NR	NR	100	100	100
D14	NR	NR	NR	NR	800	1600	400
D15	NR	NR	NR	NR	100	100	NR
D16	NR	NR	50	100	3200	3200	3200
GRUPO CONTROL (E)							
E17	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E18	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E19	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NR: No reactivo. Punto de corte 1/25

12.5 Autopsia e histopatología

Ninguna de las variantes ocasionó lesiones macroscópicas a los 21 días p.i. Microscópicamente, el cuadro lesional observado en los cuatro grupos infectados se caracterizó por nefritis, hepatitis, colecistitis y miocarditis mononuclear. En los riñones, se observó nefritis tubulointersticial y periglomerular linfocítica, multifocal, acentuada para la variante Kennewicki; para la variante Hardjo moderada y para las dos variantes restantes (Autumnalis y Canicola) leve, como se muestra en la Tabla 4.

En hígado, se visualizó hepatitis randómica mononuclear moderada en las terneras infectadas con la variante Kennewicki (Figura 1B) y leve en el caso de animales infectados con las tres variantes restantes. Se observó necrosis hepatocelular randómica en el tejido hepático de animales infectados con las variantes Autumnalis, Kennewicki y Canicola. Se constató hipertrofia de las células de kupffer en las terneras infectadas con las cuatro variantes de *Leptospira* spp. estudiadas (Tabla 4). Además, en la vesícula biliar, se observó infiltrado linfocítico con raros neutrófilos (Figura 2), leve a acentuado para las cuatro variantes (Tabla 4).

En corazón, se observó miocarditis linfocítica multifocal leve (Figura 1C) en muestras de animales infectados con las cuatro variantes y pericarditis leve en el tejido cardíaco de animales infectados con las variantes Autumnalis y Canicola (Tabla 4). No se encontraron lesiones histopatológicas de significado en los otros órganos estudiados, así como en ninguno de los órganos de los animales del grupo control (E).

Luego de la tinción Warthin-Starry, se observaron leptospiras de forma individual o fragmentadas en muestras de riñón de por lo menos un animal de cada uno de los grupos infectados (Figura 1D). En la vesícula biliar, se visualizó colecistitis linfocítica focalmente extensa para la variante Hardjo (Figura 2).

TABLA N° 4. Lesiones microscópicas encontradas en terneras infectadas por cuatro variantes de leptospiras autóctonas

Grupos	RIÑÓN	HÍGADO			VESÍCULA BILIAR	CORAZÓN	
	Nefritis intersticial	Necrosis hepatocelular	Infiltrado periportal	Hipertrofia de las células de Kupffer	Colecistitis	Miocarditis	Epicarditis
GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis							
A1	-	+	+	+	+	+	-
A2	+	-	+	+	+++	-	+
A3	-	-	+	+	+	-	+
A4	-	-	+	+	-	++	+
GRUPO B <i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki							
B5	+	-	++	+	-	+	-
B6	++	-	+	+	+	-	-
B7	+++	-	+	+	NE	-	-
B8	+	+	+	+	+	+	-
GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> Sejroe Hardjo							
C9	-	-	+	+	NE	-	-
C10	++	-	+	+	+	+	-
C11	+	-	+	+	+++	+	-
C12	++	-	+	+	+++	+	-
GRUPO D <i>L. interrogans</i> Canicola Canicola							
D13	-	-	+	+	+++	+	+
D14	+	-	+	-	+	-	-
D15	+	-	+	+	+++	+	+
D16	+	+	+	+	+++	+	-
GRUPO CONTROL (E)							
E17	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-
E19	-	-	-	-	-	-	-
E20	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausente (+) leve (++) moderada (+++) acentuada

NE: no evaluado

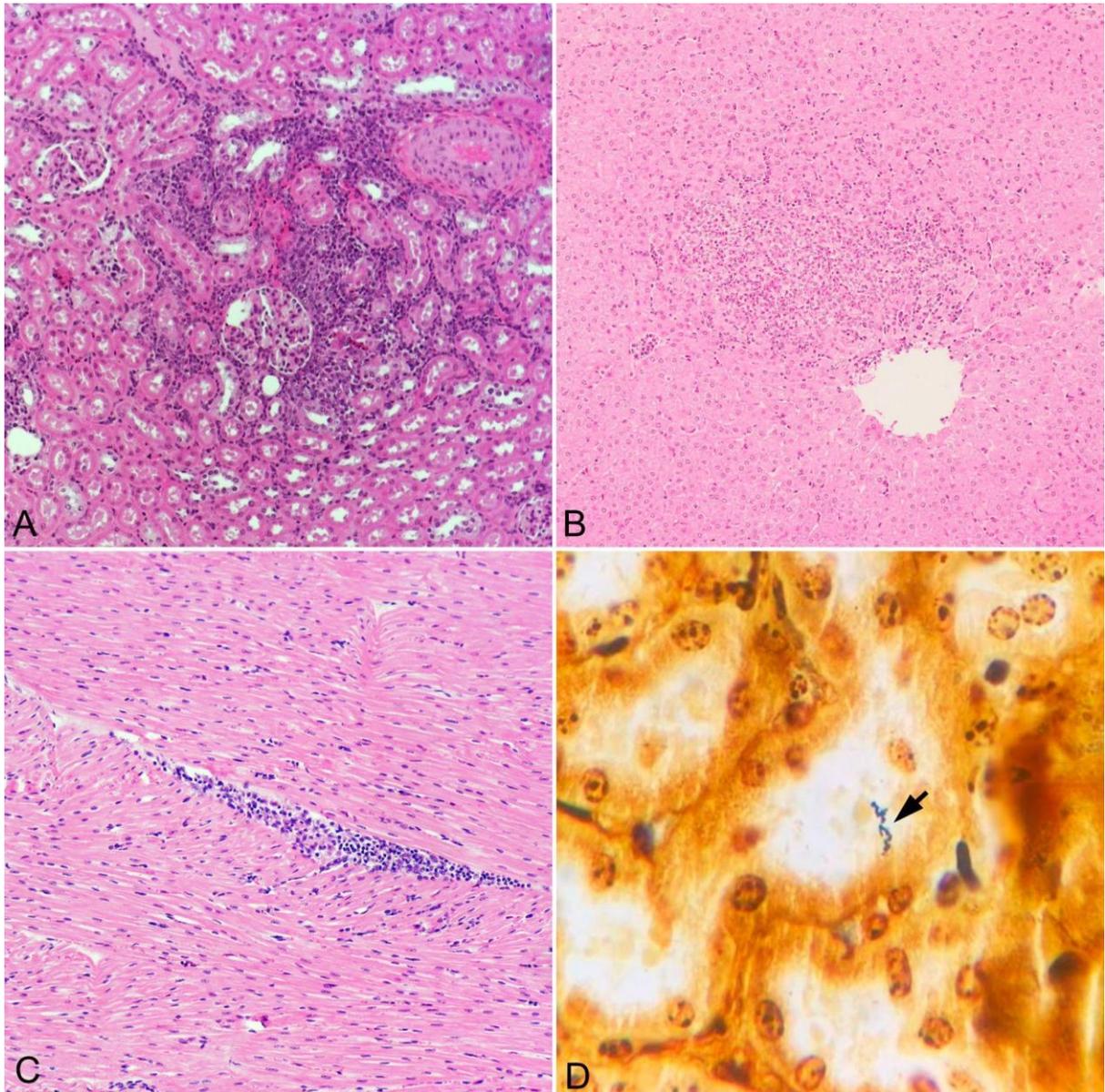


Figura 1. Lesiones histopatológicas en bovinos luego de la infección experimental con *Leptospira* spp. A. Foco de nefritis tubulointersticial linfohistiocítica. HE, 400x. B. Necrosis hepatocelular asociada a infiltrado linfohistiocitario y raros neutrófilos. HE, 400x. C. Miocarditis linfohistiocítica perivascular. HE, 400x. D. Leptospiras individuales en la luz de túbulos corticales (flecha), WS, 400x.

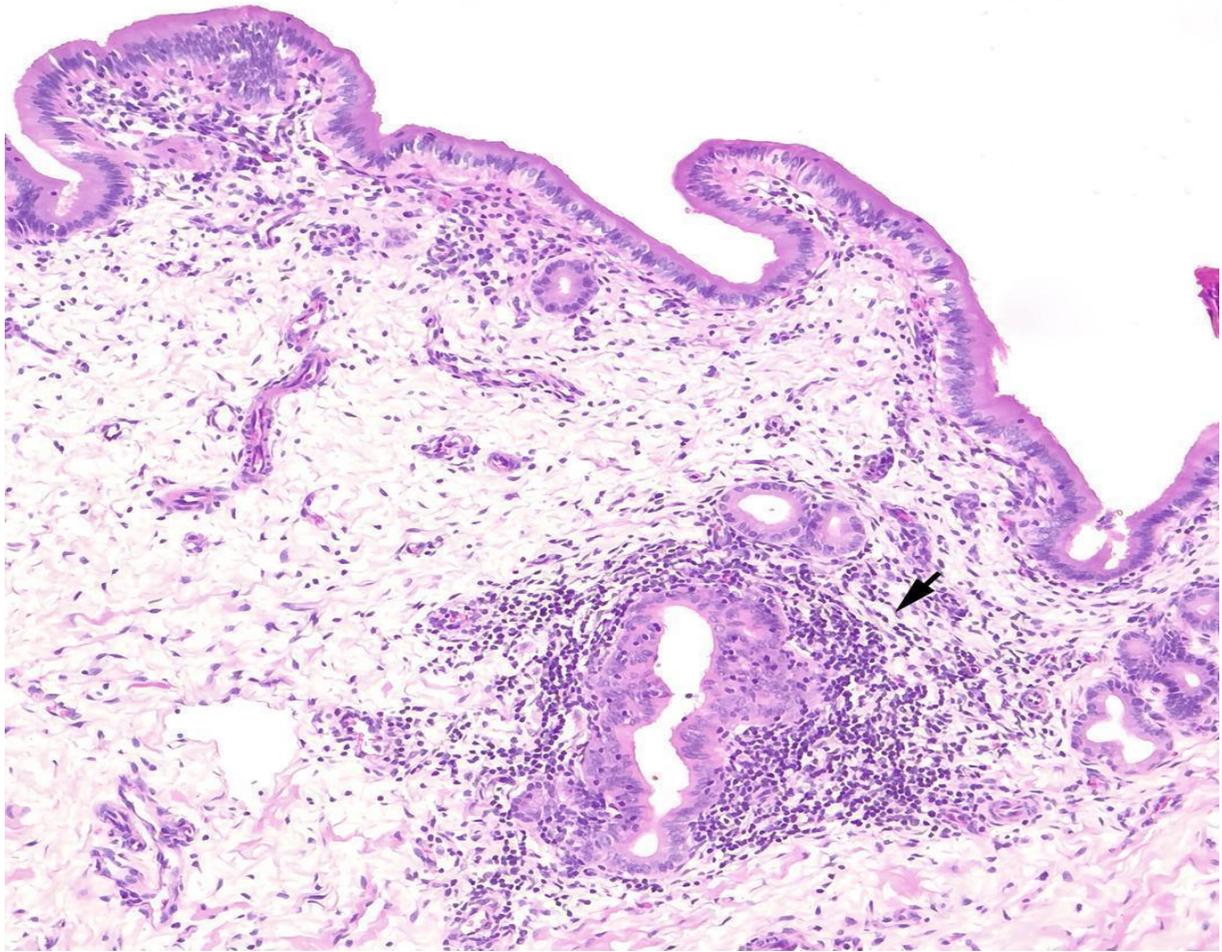


Figura 2. Histopatología en vesícula biliar en bovino infectado con *L. interrogans* Canicola Canicola. Colecistitis linfohistiocítica focalmente extensa (flecha). HE, 100x.

12.6 Inmunohistoquímica

Se detectó inmunomarcación infrecuente y multifocal en túbulos corticales por medio de la técnica de inmunohistoquímica en el tejido renal de terneras infectadas con las variantes *L. noguchii* Autumnalis y *L. interrogans* Pomona Kennewicki (Figura 3). Para la variante Hardjo se visualizó inmunomarcación focalizada en vesícula biliar (Figura 4). El tejido hepático arrojó resultados negativos para los 4 grupos infectantes al igual que el grupo control (E) (Tabla 5).

Tabla N°5. Evaluación mediante inmunohistoquímica de muestras de riñón, hígado y vesícula biliar de terneras infectadas experimentalmente por cuatro variantes autóctonas de *Leptospira* spp.

Identificación Grupo/Animal	Tejido		
	Riñón	Hígado	Vesícula biliar
A2	+	-	-
B7	+	+	-
C12	-	-	+
D16	-	-	-
E17	-	-	-
Control (ratón)	+	-	-

*Inmunomarcación infrecuente y multifocal.

**Inmunomarcación focal.

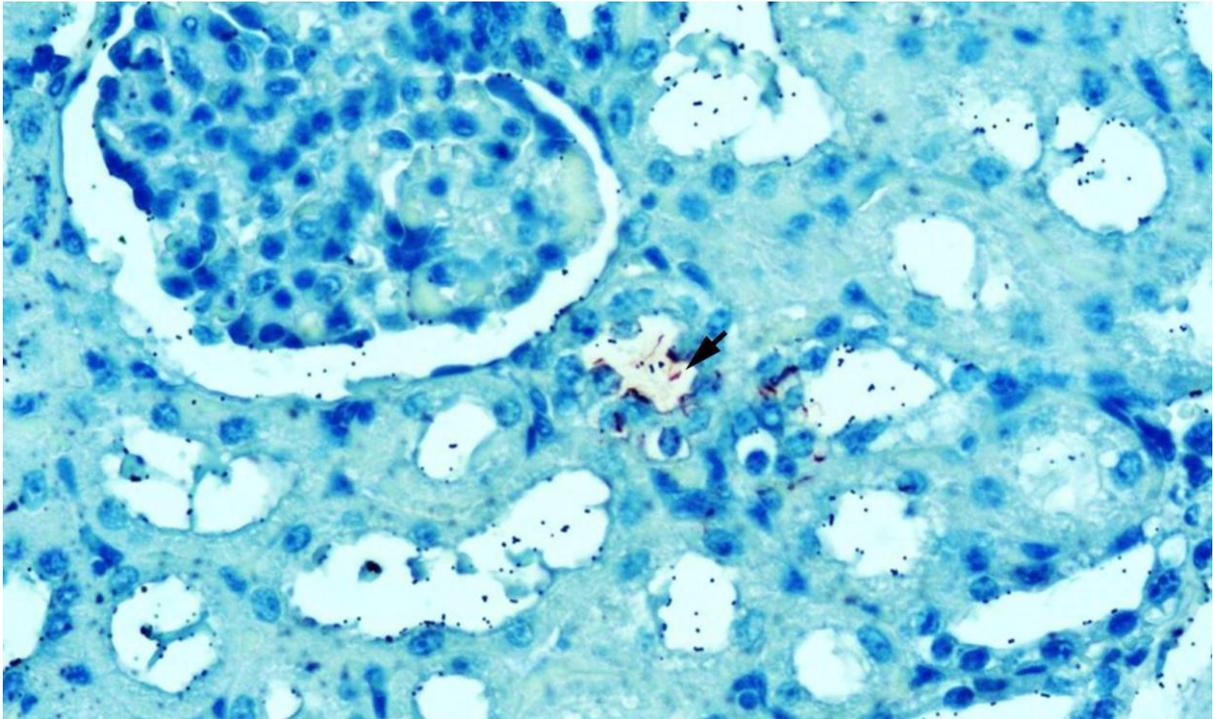


Figura 3. Inmunohistoquímica en muestra de tejido renal de bovino infectado experimentalmente con *L. interrogans* Pomona Kennewicki. Inmunomarcación positiva evidenciando leptospiras individuales en la luz de túbulo corticales (flecha). IHQ, 100x. Cortesía: Federico Giannitti (PSA, INIA).

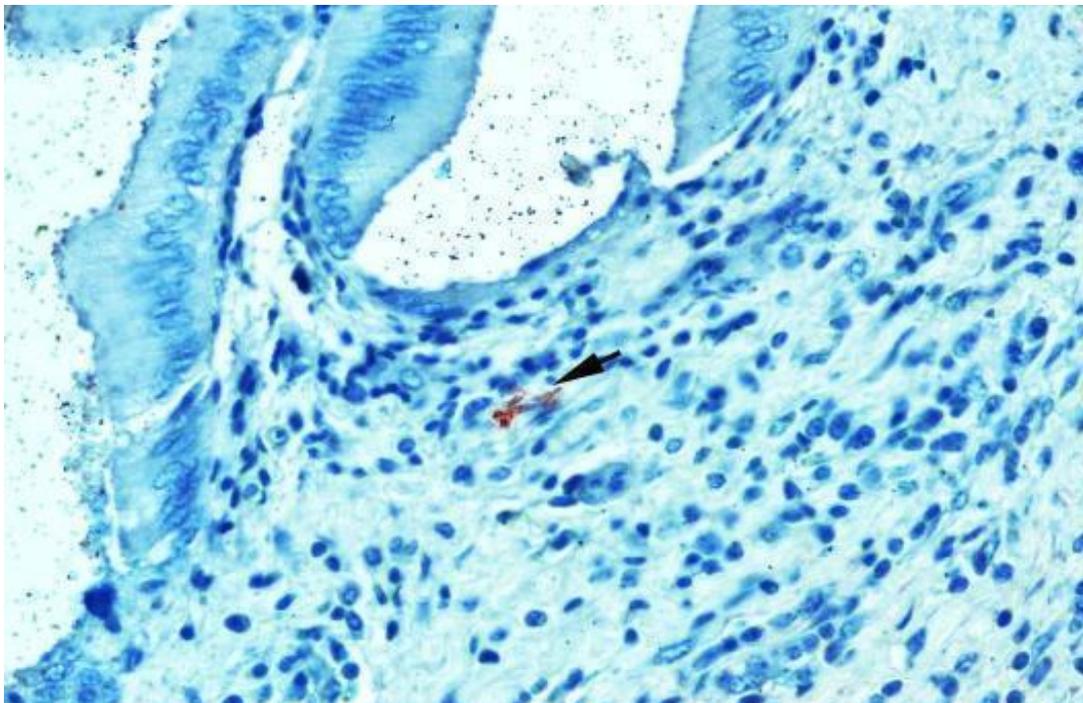


Figura 4. Inmunohistoquímica en muestra de vesícula biliar de bovino infectado experimentalmente con *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo. Inmunomarcación positiva evidenciando leptospiras en medio al infiltrado linfocitocitario. IHQ, 100x. Cortesía: Federico Giannitti (PSA, INIA).

13. DISCUSIÓN

El presente estudio, demuestra que variantes de *Leptospira* spp. autóctonas pueden infectar, causar colonización sistémica y leptospiruria, además de causar lesiones microscópicas típicas de la infección crónica en riñón, hígado, vesícula biliar y corazón en un modelo experimental bovino. Se logró infectar todas las terneras con las cuatro variantes utilizadas, *Leptospira noguchii* sg Autumnalis, *Leptospira interrogans* Pomona Kennewicki, *Leptospira borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *Leptospira interrogans* Canicola Canicola.

La utilización de terneros como modelo experimental de leptospirosis viene siendo probado desde hace muchas décadas (Bercovich et al., 1990; Durfee & Presidente, 1979; Little & Salt, 1976; Spradbrow, 1965; Thiermann & Handsaker, 1985). Sin embargo, estos autores utilizaron diferentes vías de infección, variantes e inóculos, que dificultan establecer comparaciones con el presente estudio.

Nuestros resultados demuestran que las variantes autóctonas utilizadas, pueden causar infección en bovinos cuando son inoculados por vía intraconjuntival e intranasal, probando su capacidad infectiva en un modelo de infección que busca reproducir las condiciones de infección natural por *Leptospira* spp. Estas vías ya fueron anteriormente utilizadas de forma exitosa en modelo bovino (Bercovich et al., 1990; Sullivan, 1970; Thiermann & Handsaker, 1985).

En el caso del diagnóstico serológico por microaglutinación (MAT), se obtuvieron títulos aglutinantes de todos los grupos infectados, esto demuestra que la bacteria pasó las barreras mucosas (conjuntival y nasal) y generó respuesta inmunogénica (Clough et al., 2018; Thiermann & Handsaker, 1985; Wang et al., 2022). Los primeros títulos detectados fueron para la variante Kennewicki y Hardjo, ya a los 6 días p.i de inoculación; para la variante Canicola se detectaron títulos aglutinantes a partir del día 8; y ya al día 10 p.i todas las variantes marcaron títulos aglutinantes. En el caso de la variante Kennewicki, los títulos aumentaron al día 15 p.i y luego bajaron, esto indicaría que los animales de ese grupo controlaron la infección a los 21 días p.i. Por otro lado, en los otros grupos infectados por lo menos un animal presentó reducción de los títulos o siguieron aumentando. Eso sugiere, que serían necesarios algunos días más para observar si el mismo patrón se repetiría, igual que lo observado para la variante Kennewicki.

Luego de la exposición experimental intranasal e intraconjuntival a los cuatro grupos infectantes, se evaluó la cinética de las bacterias en los animales, caracterizándose al inicio por una leptospiremia al día 1 p.i en el grupo de la variante Kennewicki y posteriormente la detección de la bacteria en orina (leptospiruria) al día 13 p.i para los cuatro grupos infectantes. A lo largo del experimento se observaron leptospiras en diferentes tejidos examinados mediante MAT, PCR, y cultivo bacteriano. Estos hallazgos demuestran la eficiencia de la infección intranasal e intraocular que logra reproducir el ciclo de la enfermedad crónica en modelo experimental bovino. Generalmente el modelo de infección crónico viene siendo probado en modelo murino (Athanzio et al., 2008; Gomes-Solecki et al., 2017).

En el caso de *L. noguchii* sg Autumnalis y *Leptospira interrogans* Canicola, no habían sido utilizadas en experimentos anteriores. Este es el primer estudio que demuestra la infección y lesiones microscópicas por estas especies en bovinos, sin embargo, las terneras Braford no fueron clínicamente afectadas durante los 21 días de estudio.

Las variantes Pomona y Canicola eran potenciales candidatas a inducir enfermedad clínica aguda en las terneras infectadas. En el caso de *Leptospira interrogans* Pomona Kennewicki ya había ocasionado dos brotes de leptospirosis en corderos (Hammond et al., 2019), y *Leptospira interrogans* Canicola Canicola afecta a los perros (Iverson et al., 2021) y humanos (Vanasco et al., 2000). Experimentalmente el serovar Pomona, ocasionó cuadro agudo en terneros, caracterizado por anorexia, fiebre, hemoglobinuria y leptospiruria (Little & Salt, 1976). Sin embargo, ninguno de los serovares utilizados en este estudio produjeron signos clínicos ni muerte a los 21 días p.i. Los animales lograron controlar la fase sistémica de la infección debido a la respuesta humoral detectada por MAT a partir del día 8 p.i.

En bovinos la enfermedad aguda es más frecuente en animales jóvenes (terneros), con un sistema inmune no maduro. La infección en terneros se puede dar intrauterina, dando como resultado terneros prematuros, o de menor peso o débiles o hasta pueden nacer muertos; otra forma, por contacto directo con la bacteria luego del nacimiento, a través de secreciones de la madre en el parto, dependiendo de la variante de leptospira que esté involucrada y del grado de inmunidad que tenga ese animal al momento de la infección desarrollando así más o menos sintomatología clínica o no (Ellis, 2015).

Las muestras de riñón, hígado y orina fueron positivas para qPCR en todos los grupos. En el caso del útero, fue positiva únicamente en el grupo A. Sin embargo, el humor vítreo, bazo, corazón y pulmón resultaron negativas. Eso refuerza que riñón, hígado y orina siguen siendo muestras de elección para diagnóstico molecular de leptospirosis (Aymée et al., 2023; Di Azevedo & Lilienbaum, 2021; Ellis, 2015).

Lesiones macroscópicas asociadas a leptospirosis aguda como ictericia, hepatomegalia y nefrosis hemoglobinúrica no fueron observadas en el presente estudio, lo que demuestra que las variantes utilizadas no causaron hemólisis intravascular a los 21 días p.i. Sin embargo, las lesiones microscópicas, sugieren infección sistémica afectando riñones, hígado, vesícula biliar y corazón en todos los grupos infectados. La nefritis intersticial y la hepatitis periportal linfocitocitaria son lesiones típicamente asociadas a leptospirosis (Hammond et al., 2019; Wilson et al. 2021) y también fueron observadas en los grupos infectados. La intensidad leve a moderada de las lesiones observadas puede estar relacionado con el corto período del ensayo, sin embargo, fueron suficientes para comprobar la infección. Fueron observadas leptospiras intralesionales en riñón con impregnación argéntica y por inmunohistoquímica semejante al observado por Wilson et al. (2021).

La colecistitis linfocitocitaria fue observada en todos los grupos infectados. Fue un hallazgo consistente con patrón semejante al descrito en humanos con

leptospirosis que fueron sometidos a colecistectomía (Guarner et al., 2001). En contraste, la colecistitis en humanos fue observada en pacientes con anorexia, fiebre, náuseas, dolor abdominal y mialgia, pero no presentaron cuadro hemolítico (Davies & Aoyagi, 2017; Guarner et al., 2001). Semejante al presente estudio, ninguno de los grupos infectados presentó cuadro hemolítico, lo que sugiere que la colecistitis puede ser causada sin asociación con la hemólisis, y caracteriza un posible síndrome asociado a leptospirosis, todavía no dilucidado. A diferencia de los casos en humanos, no se observaron manifestaciones clínicas en las terneras infectadas y lesiones fueron identificadas únicamente en la histopatología.

Recientemente, la colecistitis fue apuntada como probable manifestación de leptospirosis aguda en perros con base en ecografía, sin embargo, no fueron realizados análisis adicionales (Tintel et al., 2023). Demostramos que terneras infectadas experimentalmente desarrollaron colecistitis comprobada por histopatología. Adicionalmente, leptospiras intralesionales fueron detectadas por inmunohistoquímica. Reportamos por primera vez la colecistitis como lesión asociada a la infección por leptospira en animales domésticos. Esto pone en valor el modelo de infección experimental en el bovino para profundizar en estudios posteriores esta lesión asociada a leptospirosis.

Los casos de leptospirosis aguda son fulminantes y los animales de producción afectados normalmente están en condiciones de campo o son silvestres. Después de transcurridas algunas horas desde la muerte, la carcasa sufre autólisis rápidamente y órganos como la vesícula biliar suelen estar autolíticos, en el momento de la autopsia (Hamond et al., 2019) o posiblemente no fue considerada en la toma de muestras. Diferentemente, en los casos de leptospirosis en humanos, el atendimento hospitalario y el uso de ecografía posibilitan el diagnóstico temprano (Davies & Aoyagi, 2017; Guarner et al., 2001). Por lo tanto, los resultados que se desprenden de este trabajo evidencian la colecistitis como lesión histopatológica a ser considerada en el diagnóstico diferencial de leptospirosis.

En ternera del grupo infectado por *L. noguchii* sg Autumnalis se detectó ADN leptospiral (qPCR) y crecimiento en cultivo bacteriano, a nivel uterino, confirmando su colonización en el tracto reproductivo de la hembra al igual que da Costa Bernabé et al., (2024). Si bien no fueron observadas lesiones macro ni microscópicas en este órgano ni en ninguno de los grupos infectados al igual que da Costa Bernabé et al., (2024).

14. CONCLUSIONES FINALES

- Se desarrolló y validó un modelo de infección experimental a través de mucosas en bovinos Braford que reproduce el ciclo de infección/diseminación y colonización renal de especies patógenas de *Leptospira* spp. Este modelo resulta de interés y valor para profundizar a futuro el estudio de la fisiopatogenia de la enfermedad reproductiva asociada a la infección por *Leptospira* spp., así como también para el estudio y potencial desarrollo de nuevas herramientas de control de la enfermedad en el bovino.
- Se probó la capacidad de *Leptospira noguchii* Autumnalis, *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. interrogans* Canicola Canicola de infectar a los bovinos a través de mucosas, producir colonización renal y lesiones microscópicas.
- Durante los 21 días de seguimiento post-infección, los serovares estudiados no desencadenaron enfermedad clínica ni lesiones macroscópicas en terneras de la raza Bradford de tres meses de edad.
- Se recuperaron bacterias viables de las variantes *L. interrogans* Pomona Kennewicki (orina) y *L. interrogans* Canicola Canicola (orina, riñón e hígado).
- Muestras de riñón, hígado y orina fueron positivas para qPCR en todos los grupos, confirmando su valor como muestras de elección para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos.
- *L. noguchii* sg Autumnalis, *L. interrogans* Pomona Kennewicki, provocaron un patrón sistemático y uniforme de lesiones microscópicas en terneras afectando al riñón, hígado, corazón y vesícula biliar. Las cuatro variantes presentaron colecistitis linfocitaria con leptospiras intralesionales evidenciadas por inmunohistoquímica, lesión que sólo había sido reportada anteriormente en casos de leptospirosis en humanos.

Fondos

La Beca de Maestría de Mariana Barrios fue financiada por la ANII (POS_FSA_2019_2_1009132). El proyecto fue financiado por Innovagro (FSA_1_2018_1_152689) y fondos de INIA (CL_44). Los reactivos utilizados para inmunohistoquímica fueron costeados por el proyecto PL_27 de INIA.

15. REFERENCIAS

- Adler, B. (2015). History of leptospirosis and leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 1-9. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1
- Agudelo-Flórez, P., Restrepo, M., & Moreno, N. (2008). Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*, 28(1), 28(1),7-9.
- Ahmed, A., Engelberts, M. F., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PloS One*, 4(9), e7093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- Aymée, L., Di Azevedo, M. I. N., Reis, L., Mendes, J., Castro, F. F. A., Carvalho-Costa, F. A., Souza, G. N., & Lilenbaum, W. (2023). Unconventional Sites for Diagnosis of Leptospirosis in Bovine Anicteric Fetuses. *Animals*, 13(18), 2832. <https://doi.org/10.3390/ani13182832>
- Ajayi, O. L., Antia, R. E., Awoyomi, O. J., Oladipo, T. M., & Adebowale, O. O. (2020). Cultural, histochemical, and immunohistochemical detection of pathogenic *Leptospira* species in the kidneys of cattle slaughtered in two abattoirs in Southwest Nigeria. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 41(3), 337–353. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1736096>
- Alston, J. M., & Broom, J. C. (1958). *Leptospirosis in Men and Animals*. E. & S. Livingstone
- Arboleda, M., Mejía-Torres, M., Posada, M., Restrepo, N., Ríos-Tapias, P., Rivera-Pedroza, L. A., Calle, D., Sánchez-Jiménez, M. M., Marín, K., & Agudelo-Flórez, P. (2023). Molecular Diagnosis as an Alternative for Public Health Surveillance of Leptospirosis in Colombia. *Microorganisms*, 11(11), 2759. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112759>
- Athanazio, D. A., Silva, E. F., Santos, C. S., Rocha, G. M., Vannier-Santos, M. A., McBride, A. J., Ko, A. I., & Reis, M. G. (2008). *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica*, 105(2), 176-180. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.012>

- Aycardi, E., Rivera, B., Torres, B., & De Bohórquez, V. (1982). Experimental infection with a *Leptospira hardjo* strain isolated from cattle of the eastern plains of Colombia. *Veterinary Microbiology*, 7(6), 545-550. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(82\)90048-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(82)90048-7)
- Azizi, S., Kheirandish, R., & Rahimi, E. (2014). Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect *Leptospira* spp. in kidneys of slaughtered cattle. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 81(1), e1-e6. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v81i1.821>
- Bañales, P., Fernandez, L., Repiso, M. V., Gil, A., Dargatz, D. A., & Osawa, T. (2006). A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.004>
- Bercovich, Z., Taaijke, R., & Bokhout, B. A. (1990). Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, 21(3), 255-262. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90036-u](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90036-u)
- 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. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Bielanski, A., & Surujballi, O. (1998) Penetration of in vitro fertilized bovine embryos by *Leptospira* after in vitro exposure. *Theriogenology*, 49, 250
- Boey, K., Shiokawa, K., & Rajeev, S. (2019). *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(8), e0007499. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>
- Bonhomme, D., & Werts, C. (2022). Host and species-specificities of pattern recognition receptors upon infection with *Leptospira interrogans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 932137. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.932137>
- Caimi, K., & Ruybal, P. (2020). *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. Infection, genetics and evolution. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 81, 104241. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>
- Cecco, B.S., Molossi, F.A., Henker, L.C., Lorenzetti, M.P., Correa, G.L.F., Driemeier, D., Pavarini, S.P., & Sonne L. (2021). Causes of death in sheep in Southern Brazil: analysis of 523 cases (2004-2019). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 41, e06886.
- Cheuquepán Valenzuela, F., Recavarren, M., Quintana, S., Cantón, G., Odeón, A., Marin, M., & Morrell, E. (2020). Improvement of *Leptospira* spp. diagnosis in

aborted bovine fetuses by qPCR. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 73, 101555. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101555>

Clough, W. J., Little, P. R., Hodge, A., Chapman, V. C., & Holz, D. K. (2018). Protection of sheep by vaccination against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo and *L. interrogans* serovar Pomona. *New Zealand Veterinary Journal*, 66(3), 138-143. <https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1441078>

Cianciolo, R.E., & Mohr, F.C. (2016) Urinary System. En M.G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals* (6th ed., Vol. 2, p. 449). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00010-3>

Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Grünberg, W., & Radostits, O. M. (2017). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats* (11^aed.). Elsevier.

Corbellini, L. G., Pescador, C. A., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D. R., & Driemeier, D. (2006). Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Veterinary Journal*, 172(1), 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.03.006>

Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., & Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

da Costa Barnabé, N. N., Soares, R. R., Barros, D. K. S., Araújo Júnior, J. P., Malossi, C. D., Rodrigues Silva, M. L. C., Brasil, A. W. L., da Costa, D. F., Higino, S. S. D. S., Santos, C. S. A. B., de Azevedo, S. S., & Alves, C. J. (2024). The Role of Transplacental Infection in *Leptospira* spp. Epidemiology in Cattle in Caatinga Biome, Brazil. *Microorganisms*, 12(6), 1044. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061044>

Davies, P., & Aoyagi, Y. (2017). Leptospirosis presenting as acute acalculous cholecystitis. *Clinical Case Reports*, 5(11), 1775-1779. <https://doi.org/10.1002/ccr3.1173>

Delgado, F., Brihuega, B.F., Venzano, A., Funes, D., Viera, F.J., Auteri, C., Romero, G., Capellino, F., & Sarmiento, L. (2007). Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59, 14-18.

Di Azevedo, M. I. N., & Lilenbaum, W. (2021). An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology*, 72(5), 496-508. <https://doi.org/10.1111/lam.13442>

Doncel Díaz, B. (2022). *Descarte de vacas en rodeos lecheros de Uruguay y diagnóstico de dos enfermedades no descritas en vacas lecheras del país*

[Tesis de doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí.

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/34686/1/TD%20Doncel%20Benjam%c3%adn.pdf>

- Dorsch, M. A., Francia, M. E., Tana, L. R., González, F. C., Cabrera, A., Calleros, L., Sanguinetti, M., Barcellos, M., Zarantonelli, L., Ciuffo, C., Maya, L., Castells, M., Mirazo, S., da Silva Silveira, C., Rabaza, A., Caffarena, R. D., Doncel Díaz, B., Aráoz, V., Matto, C., ... Giannitti, F. (2022). Diagnostic investigation of 100 cases of abortion in sheep in Uruguay: 2015-2021. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 904786. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.904786>
- 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. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 42-44. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000100009>
- Durfee, P. T., & Presidente, P. J. (1979). Experimental infection of calves and sheep with *Leptospira interrogans* serovar balcanica. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 57(5), 447-453. <https://doi.org/10.1038/icb.1979.45>
- Dutra, F. (2017). Leptospirosis aguda en cordero. *Archivo Veterinario del Este*, (20), 1-24.
- Dutra Quintela, F. (2019). Enfermedades diagnosticadas. *Archivo Veterinario del Este*, (22). <https://www.smvu.com.uy/wp-content/uploads/2023/06/Archivo-Veterinario-del-Este-2019.pdf>
- Easton, C. (2006). *Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay* [Tesis de Maestría inédita]. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
- Ellis, W.A. (1984). Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1-4), 411-421.
- Ellis, W.A. (1990) Leptospirosis; a review of veterinary aspects. *Irish Veterinary Journal*, 12, 6-12.
- Ellis, W.A. (2015). Animal Leptospirosis. En B. Adler (Eds.), *Leptospira and Leptospirosis* (Vol. 387, pp. 99-137). Springer. https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/978-3-662-45059-8_6
- 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.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. MediSci.

- Garcia-Pintos, C., Riet-Correa, F., & Menchaca, A. (2021). Effect of foot-and-mouth disease vaccine on pregnancy failure in beef cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 761304. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.761304>
- Gibson, K. H., Trajtenberg, F., Wunder, E. A., Brady, M. R., San Martin, F., Mechaly, A., Shang, Z., Liu, J., Picardeau, M., Ko, A., Buschiazzi, A., & Sindelar, C. V. (2020). An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. *eLife*, 9, e53672. <https://doi.org/10.7554/eLife.53672>
- Gomes-Solecki, M., Santecchia, I., & Werts, C. (2017). Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. *Frontiers in Immunology*, 8, 58. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00058>
- Guarner, J., Paddock, C. D., Bartlett, J., & Zaki, S. R. (2008). Adrenal gland hemorrhage in patients with fatal bacterial infections. *Modern Pathology*, 21(9), 1113-1120. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.98>
- Guarner, J., Shieh, W. J., Morgan, J., Bragg, S. L., Bajani, M. D., Tappero, J. W., & Zaki, S. R. (2001). Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon. *Human Pathology*, 32(7), 750-752. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.25599>
- Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 65-97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
- Hamond, C., Silveira, C. S., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Salaberry, X., Aráoz, V., Costa, R. A., Rivero, R., Giannitti, F., & Zarantonelli, L. (2019). *Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki infection in two sheep flocks with acute leptospirosis in Uruguay. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(3), 1186-1194. <https://doi.org/10.1111/tbed.13133>
- Hamond, C., & Riet-Correa, F. (2023). Leptospirose. En F. Riet-Correa, A.L. Schild, R. Lemos, J.R. Borges, F.S. Mendonça, & M. Machado, *Doenças de Ruminantes e Equídeos* (4ª Ed., Vol. I, pp.333-345). MedVet.
- Harrison, T. (2006). *Principios de Medicina Interna* (16° ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Higgins, R. J., Harbourne, J. F., Little, T. W., & Stevens, A. E. (1980). Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. *The Veterinary Record*, 107(13), 307-310. <https://doi.org/10.1136/vr.107.13.307>
- Hilbe, M., Posthaus, H., Paternoster, G., Schuller, S., Imlau, M., & Jahns, H. (2023). Exudative glomerulonephritis associated with acute leptospirosis in dogs. *Veterinary Pathology*, 61(3), 453-461. <https://doi.org/10.1177/03009858231207020>

- Hr, S., Keech, H. L., & Di, B. (1961). Histopathologic and serologic study of subclinical leptospirosis among cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 138, 424-430.
- Hsu, S. H., Chang, M. Y., Lin, S. M., Ko, Y. C., Chou, L. F., Tian, Y. C., Hung, C. C., & Yang, C. W. (2021). Peptidoglycan mediates *Leptospira* outer membrane protein Loa22 to toll-like receptor 2 for inflammatory interaction: a novel innate immune recognition. *Scientific Reports*, 11(1), 1064. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79662-8>
- Hsu, S. H., & Yang, C. W. (2022). Insight into the structure, functions, and dynamics of the *leptospira* outer membrane proteins with the pathogenicity. *Membranes*, 12(3), 300. <https://doi.org/10.3390/membranes12030300>
- Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kaneko, R., & Ito, H. (1916). The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *The Journal of Experimental Medicine*, 23(3), 377.
- Instituto Nacional de la Carne. (2021). Stock bovino y ovino, existencias al 30 de junio - 2012-2021. En *Anuario estadístico 2021* (pp. 1-104). INAC.
- Instituto Nacional de la Leche. (2021). *Escenarios para la lechería uruguaya 2021/2022 Mercados, producción, precios y costos*. https://www.inale.org/wp-content/uploads/2021/11/Escenarios-para-la-lecheria-uruguaya-2021-2022_editado-para-web_comp.pdf
- Iverson, S. A., Levy, C., Yaglom, H. D., Venkat, H. L., Artus, A., Galloway, R., Guagliardo, S. A. J., Reynolds, L., Kretschmer, M. J., LaFerla Jenni, M. E., Woodward, P., Reindel, A. A., Tarrant, S., Sylvester, T., Klein, R., Mundschenk, P., Sunenshine, R., & Schafer, I. J. (2021). Clinical, diagnostic, and epidemiological features of a community-wide outbreak of canine leptospirosis in a low-prevalence region (Maricopa County, Arizona). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 258(6), 616-629. <https://doi.org/10.2460/javma.258.6.616>
- Johnson, R. C., & Harris, V. G. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. I. Growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 94(1), 27-31. <https://doi.org/10.1128/jb.94.1.27-31.1967>
- Koval, A. A., Brihuega, B. F., Grune Löffler, S., López, S., Saint Martin, M., Lagioia, G. G., & Insaugarat, J. R. (2020). Primer aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo Bovis a partir de un caso clínico en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 198-201. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.002>
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. Clínica. *Microbiological Reviews*, 14(2), 296-326.
- Levett, P.N. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. Systematics of Leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 11-20.

- Little, T. A., & Salt, G. F. (1976). The experimental infection of calves with a British leptospire of the Pomona serogroup. *Research in Veterinary Science*, 21(3), 363-364.
- Lucena, R.B., Pierezan, F., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Figuera, R.A., & Barros, C.S.L. (2010). Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(5), 428-434. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500010>
- Macchi, M. V., Suanes, A., Salaberry, X., Dearmas, B. E., Rivas, E., Piaggio, J., & Gil, A. D. (2024). Leptospirosis as a cause of infertility in Uruguayan beef cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 228, 106227. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106227>
- Machado, M., Ciuffo, C., Giannitti, F., Silveira, C.S., Perdomo, Y., Queiroz-Machado, C.R.R., Carriquiry, R., Zarantonelli, L., Menchaca, A. 2025. Acute fatal *Leptospira kirschneri* infection in suckling lambs and calves in Uruguay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. En prensa.
- Macías-Rioseco, M., Silveira, C., Fraga, M., Casaux, L., Cabrera, A., Francia, M.E., Robello, C., Maya, L., Zarantonelli, L., Suanes, A., Colina, R., Buschiazzi, A., Giannitti, F., & Riet-Correa, F. (2020). Causes of abortion in dairy cows in Uruguay. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40(5), 325-332.
- Marshall, R. B. (1974). Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infection with *Leptospira interrogans* serotype pomona. *Journal of Medical Microbiology*, 7(4), 505-508. <https://doi.org/10.1099/00222615-7-4-505>
- Matsunaga, J., Barocchi, M. A., Croda, J., Young, T. A., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A., & Ko, A. I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, 49(4), 929-945. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x>
- Meny, P., Menéndez, C., Ashfield, N., Quintero, J., Ríos, C., Iglesias, T., Schelotto, F., & Varela, G. (2019). Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.005>
- 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 Sao Paulo*, 59, e79. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759079>
- Merwick, A., Kelly, S., & Galvin, R. (2008). Meningitis due to leptospira hardjo-- identifying a treatable cause of aseptic lymphocytic meningitis. *Irish Medical Journal*, 101(3), 91.

- Meyer Zarzar, L.P. (2013). *Estudio descriptivo de las principales causas de aborto bovino diagnosticados entre los años 1990 y 2010 en el Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile* [Tesis de maestría, inédita]. Universidad Austral de Chile.
- Michael, M., Fry and M. Donald McGavin. (2013). Medula ósea, células sanguíneas e sistema linfático. En M. Donald McGavin, James F. Zachary. *Bases de la Patología en Veterinaria*. (5ª ed., pp. 701-773). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2012). *Técnicas de eutanasia en bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suinos y otras especies*. De https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-07/PR_CEUA_02_EUTANASIA_GRANDES_ANIMALES_0.pdf
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2019). *Estadísticas Agropecuarias Estadísticas del Sector Lácteo 2019*. DIEA. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/estadisticas-del-sector-lacteo-2019>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2023). *Datos Actualizados basados en la Declaración Jurada de Existencias DICOSE – SNIG 2023*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/datos-actualizados-basados-declaracion-jurada-existencias-dicose-snig-0>
- Morgan, J., Bornstein, S. L., Karpati, A. M., Bruce, M., Bolin, C. A., Austin, C. C., Woods, C. W., Lingappa, J., Langkop, C., Davis, B., Graham, D. R., Proctor, M., Ashford, D. A., Bajani, M., Bragg, S. L., Shutt, K., Perkins, B. A., Tappero, J. W., & Leptospirosis Working Group. (2002). Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clinical Infectious Diseases*, 34(12), 1593-1599. <https://doi.org/10.1086/340615>
- Nakamura, S. (2022). Motility of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*: Insight into Association with Pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1859. <https://doi.org/10.3390/ijms23031859>
- Nieves Alvarez, C. (2018). *Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género Leptospira: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación* [Tesis de maestría, Facultad de Ciencias- PEDECIBA, Universidad de la República]. Colibrí. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). Leptospirosis. En *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021*.

https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_L_EPTO.pdf

- Pereira, M. M., Da Silva, J. J., Pinto, M. A., Da Silva, M. F., Machado, M. P., Lenzi, H. L., & Marchevsky, R. S. (2005). Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(1), 13-20.
- Petakh, P., Isevykh, V., Kamyshnyi, A., & Oksenykh, V. (2022). Weil's Disease-Immunopathogenesis, Multiple Organ Failure, and Potential Role of Gut Microbiota. *Biomolecules*, 12(12), 1830. <https://doi.org/10.3390/biom12121830>
- Picardeau, M. (2013) Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1-9.
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Podgoršek, D., Ružić-Sabljić, E., Logar, M., Pavlović, A., Remec, T., Baklan, Z., Pal, E., & Cerar, T. (2020). Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiology*, 20(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>
- Poonacha, K. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Hong, C. B., Petrites-Murphy, M. B., Smith, B. J., Swerczek, T. W., Tramontin, R. R., & Tuttle, P. A. (1993). Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Veterinary Pathology*, 30(4), 362-369. <https://doi.org/10.1177/030098589303000405>
- Reis, M. de O., Caprioli, R. A., Laisse, C. J. M., Guimarães, L.L.B., Andrade, C.P. de, Boabaid, F.M., Sonne, L., & Driemeier, D. (2017). Surto de leptospirose em bezerros criados em resteva de arroz. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(9), 937-940. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000900007>
- Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., Herrera, B., Nuñez, A., Olivera, M., Osawa, T., & Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 40(157), 5-28. <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/368>
- Rissi, D. R., Pierezan, F., Oliveira Filho, J.C., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Kommers, G.D., & Barros, C.S.L. (2010). Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(1), 21-28. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000100004>
- Ritchie, A. E., & Johnson, R. C. (1976). *The Biology of Parasitic Spirochetes*. Academic Press.

- Salgado, M., Otto, B., Moroni, M., Sandoval, E., Reinhardt, G., Boqvist, S., Encina, C., & Muñoz-Zanzi, C. (2015). Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile. *BMC Veterinary Research*, 11, 66. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0369-x>
- 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 Sao Paulo*, 54(2), 69-75. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652012000200003>
- Schild, C. O., Caffarena, R. D., Gil, A., Sánchez, J., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2020). A survey of management practices that influence calf welfare and an estimation of the annual calf mortality risk in pastured dairy herds in Uruguay. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9418-9429. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18177>
- Schneider, M. C., Nájera, P., Aldighieri, S., Bacallao, J., Soto, A., Marquiño, W., Altamirano, L., Saenz, C., Marin, J., Jimenez, E., Moynihan, M., & Espinal, M. (2012). Leptospirosis outbreaks in Nicaragua: identifying critical areas and exploring drivers for evidence-based planning. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(11), 3883-3910. <https://doi.org/10.3390/ijerph9113883>
- Seguel, M., Muñoz, F., Paredes, E., Navarrete, M. J., & Gottdenker, N. L. (2017). Pathological Findings in Wild Rats (*Rattus rattus*) Captured at Guafo Island, Northern Chilean Patagonia. *Journal of Comparative Pathology*, 157(2-3), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.07.006>
- Semskov, M.V. (1940). To the materials on etiology of infectious yellow fever of cattle. *Sovetskaya Veterinaria*, 6, 22-23
- Smith, B.P., Van Metre, D.C., & Pusterla, N. (2019). Large animal internal medicine (6^a ed.). Elsevier.
- Smyth, J. A., Fitzpatrick, D. A., & Ellis, W. A. (1999). Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. *The Veterinary Record*, 145(19), 539-542. <https://doi.org/10.1136/vr.145.19.539>
- Spradbrow P. B. (1965). Experimental *Leptospira australis* infection in calves. *Australian Veterinary Journal*, 41(12), 391-393. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1965.tb04560.x>
- Stimson, A. M. (1907). Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports (1896-1970)*, 22(18), 541.
- Sullivan, N. D. (1970). Experimental infection of cattle with *Leptospira hardjo*. *Australian Veterinary Journal*, 46(4), 121-122. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1970.tb01968.x>

- Szeredi, L., & Haake, D. A. (2006). Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Veterinary Pathology*, 43(5), 755-761. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-755>
- Tejada Caminiti, R., Romaní Romaní, F., Wong Chero, P., & Alarcón Villaverde, J. (2011). Prácticas laborales de riesgo en cultivadores de arroz del valle del Alto Mayo, región San Martín, Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, 15(1), 50-55.
- 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.
- Thiermann, A. B., & Handsaker, A. L. (1985). Experimental infection of calves with *Leptospira interrogans* serovar hardjo: conjunctival versus intravenous route of exposure. *American Journal of Veterinary Research*, 46(2), 329-331.
- Tintel, M. J., Rivas, J., & Marini, R. (2023). Acute acalculous cholecystitis as a manifestation of Canine Leptospirosis. *Salud, Ciencia Y Tecnología*, 3, 334. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2023334>
- van de Maele, I., Claus, A., Haesebrouck, F., & Daminet, S. (2008). Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *The Veterinary Record*, 163(14), 409-413. <https://doi.org/10.1136/vr.163.14.409>
- Van der Hoeden, J. (1953). Leptospirosis among goats in Israel. *Journal of Comparative Pathology*, 63(2), 101-111. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(53\)80012-3](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(53)80012-3)
- Vanasco, N. B., Sequeira, G., Dalla Fontana, M. L., Fusco, S., Sequeira, M. D., & Enría, D. (2000). Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 7(1), 35-40. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892000000100006>
- Velineni, S., Timoney, J. F., Artiushin, S. C., Donahue, J. M., & Steinman, M. (2016). Multiple specificities of immunoglobulin M in equine fetuses infected with *Leptospira interrogans* indicate a competent immune response. *Equine Veterinary Journal*, 48(6), 704-709. <https://doi.org/10.1111/evj.12527>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M. K. N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Wang, J., Zhang, W., Jin, Z., Ding, Y., Zhang, S., Wu, D., & Cao, Y. (2022). A lethal model of *Leptospira* infection in hamster nasal mucosa. *PLoS Neglected*

- Wilson, T. M., Ritter, J. M., Martines, R. B., Gonçalves, A. A. B., Fair, P., Galloway, R., Weiner, Z., Romano, A. P. M., Costa, G. R. T., Melo, C. B., Zaki, S. R., & Castro, M. B. (2021). Pathology and One Health implications of fatal *Leptospira interrogans* infection in an urbanized, free-ranging, black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3207–3216. <https://doi.org/10.1111/tbed.14287>
- Wolbach, S. B., & Binger, C. A. (1914). Notes on a filterable Spirochete from fresh Water. *Spirocheta biflexa* (new Species). *The Journal of Medical Research*, 30(1), 23-26.1.
- Yeruham, I., Bernstein, M., Perl, S., Irlin, S., Cohen, A., Yacobson, B., & Machnai, B. (1997). Clinical and epizootiological study of a leptospirosis outbreak due to *Leptospira canicola* in a feedlot. *Journal of the South African Veterinary Association*, 68(3), 105-107. <https://doi.org/10.4102/jsava.v68i3.886>
- 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. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9), e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>