



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**LEPTOSPIROSIS BOVINA EN PREDIOS GANADEROS DEL  
URUGUAY: Dinámica de infección en vacas preñadas, evaluación de  
afecciones reproductivas y vínculo epidemiológico con otras especies  
domésticas.**

**MACCHI, MARÍA VALENTINA**

**TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2025**

**ESTA HOJA VA EN BLANCO**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**LEPTOSPIROSIS BOVINA EN PREDIOS GANADEROS DEL  
URUGUAY: Dinámica de infección en vacas preñadas, evaluación de  
afecciones reproductivas y vínculo epidemiológico con otras especies  
domésticas.**

**MACCHI, MARÍA VALENTINA**

---

**Andrés Gil**

**Director de Tesis**

**2025**



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

175  
AÑOS



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

## ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

Materia: PHD01 TESIS DE DOCTORADO

Orientación: Salud Animal

Período: MARZO 2025

Fecha Evaluación: 25/03/2025

Hora: 12:30 hs

Lugar: Salón 103

Sede Central. Ruta 8, km 18 Montevideo, Uruguay 13.000

Tribunal:

Presidente: Fernando Dutra

2° Integrante: Luis Samartino

3° Integrante: Javier Sanchez

| C.I.        | Nombre                         | Concepto  | Nota |
|-------------|--------------------------------|-----------|------|
| 4.500.790-8 | María Valentina MACCHI VAZQUEZ | EXCELENTE | E    |

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

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

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Fernando Dutra

Dr. Luis Samartino

Dr. Javier Sánchez



Ruta 8 Km.18



[www.fvet.edu.uy](http://www.fvet.edu.uy)



Teléfono: 1903

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Andrés Gil por darme la oportunidad de realizar este trabajo y orientarme durante mi formación.
- A Alejandra Suanes, Ximena Salaberry y todo el equipo técnico del Dilave por el apoyo y colaboración durante el proyecto.
- A Florencia Pierruccioni y Joaquin Armua por su colaboración en los muestreos y en el procesamiento de las muestras.
- A Bruno Dearmas y Emiliano Rivas por todo el trabajo realizado.
- Al Instituto Pasteur, puntualmente a Leticia Zarantonelli y Camilia Cuffio, por su colaboración y apoyo.
- A los veterinarios de libre ejercicio que propusieron los predios para investigar y colaboraron con los muestreos: Dr. José Luis Callero, Dr. Andrea Alves, Dr. Mauricio Alonso, Dr. Eduardo Lorenzelli, Dr. Florencia Correa, Dr. Agustin Saa, Dr. Victoria Ponz, Dr. Martin Marti nicorena, Dr. Andrés Hiriart
- A la ANII por la financiación de la beca de doctorado.
- A la biblioteca de la Facultad de Veterinaria por su disponibilidad a la hora de solicitar bibliografía.
- A mi familia y amigos por acompañarme y apoyarme durante esta etapa.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                                                | 5  |
| SUMMARY .....                                                                                               | 7  |
| Antecedentes Específicos.....                                                                               | 9  |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                           | 9  |
| TRANSMISIÓN Y PATOGÉNIAS.....                                                                               | 11 |
| HOSPEDEROS .....                                                                                            | 12 |
| LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS.....                                                                               | 14 |
| Epidemiología .....                                                                                         | 16 |
| Diagnóstico.....                                                                                            | 19 |
| Control.....                                                                                                | 22 |
| ANTECEDENTES EN URUGUAY .....                                                                               | 23 |
| REFERENCIAS .....                                                                                           | 25 |
| Caracterización del problema.....                                                                           | 33 |
| Objetivos .....                                                                                             | 36 |
| OBJETIVO GENERAL.....                                                                                       | 36 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                 | 36 |
| <b>CAPÍTULO I: Leptospirosis as a cause of infertility in Uruguayan beef cattle</b><br>.....                | 37 |
| <b>CAPÍTULO II: Leptospirosis como causa de aborto en ganado para<br/>producción carne en Uruguay. ....</b> | 38 |
| RESUMEN.....                                                                                                | 38 |
| SUMMARY .....                                                                                               | 40 |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                           | 41 |

|                                                                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                       | 42         |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                                  | 47         |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                  | 49         |
| CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                 | 51         |
| REFERENCIAS .....                                                                                                                                                | 52         |
| <b>CAPÍTULO III: Dinámica de enfermedad e infección por <i>Leptospira spp.</i> en vacas preñadas a través de serología y detección de excreción por orina...</b> | <b>55</b>  |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                     | 55         |
| SUMMARY .....                                                                                                                                                    | 57         |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                | 59         |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                       | 62         |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                                  | 67         |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                  | 78         |
| CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                 | 81         |
| REFERENCIAS .....                                                                                                                                                | 82         |
| <b>CAPÍTULO IV: Vínculo epidemiológico entre bovinos y otras especies domésticas en sistemas ganaderos del Uruguay. ....</b>                                     | <b>87</b>  |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                     | 87         |
| SUMMARY .....                                                                                                                                                    | 89         |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                | 91         |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                       | 92         |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                                  | 95         |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                  | 99         |
| CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                 | 103        |
| REFERENCIAS .....                                                                                                                                                | 103        |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>                                                                                                                              | <b>108</b> |

|               |     |
|---------------|-----|
| ANEXO I ..... | 111 |
|---------------|-----|

## RESUMEN

La Leptospirosis es una zoonosis bacteriana ampliamente distribuida tanto a nivel mundial como en Latino América. En Uruguay, su presencia se la ha asociado a los bovinos, aunque se sabe afecta a múltiples animales domésticos y silvestres, incluyendo al ser humano. Si bien se han aislado diferentes cepas de *Leptospira* en bovinos, se desconoce el impacto reproductivo que ocasionan. Este trabajo tuvo por objetivo evaluar la dinámica de infección de *Leptospira spp.* en vacas preñadas tanto mediante diagnóstico serológico como por técnicas moleculares. Por otro lado, se evaluó el impacto de la leptospirosis en afecciones reproductivas (perdidas tempranas y abortos) en bovinos de carne; y se estudió otras especies domésticas en contacto con bovinos como posibles transmisores de la enfermedad. Se evaluaron 31 predios ganaderos distribuidos por todo el territorio del Uruguay. En cada predio se realizaron tres muestreos: al momento del diagnóstico de preñez por ecografía (T1), en el segundo tercio de gestación (T2), y un último muestreo post parto (T3). En el T1 se muestreó de forma aleatorio 10 vacas falladas al momento de la ecografía y se seleccionó para su seguimiento en los sucesivos muestreos a 25 vacas preñadas de menos de tres meses de gestación. A cada vaca en cada muestreo, se les tomó muestra de sangre y orina, a la vez se realizó una encuesta a los veterinarios de libre ejercicio encargados del predio. Se colectó muestras de sangre por única vez a hasta 30 ovinos, hasta 10 equinos según la cantidad de hubiera en cada predio y a la totalidad de los caninos que estaban en contacto con bovinos. Con las muestras de sangre se realizó diagnóstico serológico por la técnica de microaglutinación. Con las muestras de orina se realizó aislamiento bacteriano y qPCR. Durante el período de 2020 a 2022 se muestrearon un total de 778 vacas preñadas y 303 vacas vacías provenientes de 31 predios ganaderos. Se tomaron muestras de sangre de 723 ovinos, 203 equinos y 93 caninos. Los serogrupos más seroprevalentes en las vacas fueron el Sejroe y Pomona, siendo el 33,6% y 4,2% seropositivos respectivamente. El 31,2% de las vacas fueron positivas a qPCR en el primer muestreo, solo el 3,21% fueron positivas en los tres muestreos realizados. Se logró el aislamiento de 51 cepas de

*Leptospira* pertenecientes a cuatro especies: *L. Borgpetersenii*, *L. Interrogans*, *L. Noguchii* y *L. Santarosai*. Se encontró una asociación entre infertilidad y el serogrupo Sejroe (OR=1,31), y los niveles de excreción de la bacteria por orina (10-100 copias de leptospira/mL de orina: OR=1,4; >100 copias de leptospira/mL de orina: OR=2,34). Por otro lado, se encontró una asociación entre el serogrupo Pomona y el aborto en las vacas (OR=8,06). Se observó una correlación entre la seroprevalencia intrapredial del serogrupo Sejroe de bovinos con la de ovinos y equinos, lo que sugiere la participación en el ciclo epidemiológico de la bacteria. Se encontró una gran difusión de la *Leptospira* en los predios ganaderos estudiados, con grandes niveles de excreción y gran variabilidad de cepas circulantes. La asociación encontrada entre la leptospirosis y las afecciones reproductivas sugiere que esta bacteria contribuye a afectar los índices reproductivos en los rodeos, por lo que su control es fundamental a la hora de optimizar la producción en los predios. Dada lo difundida que está la bacteria, no solo en bovinos, sino que también en otras especies domésticas, la gran variabilidad de cepas circulantes, y la complejidad del ciclo epidemiológico; resulta fundamental el control de la enfermedad y la educación a nivel de salud pública.

## SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial zoonosis widely distributed globally and in Latin America. In Uruguay, its presence has been associated with cattle, although it is known to affect multiple domestic and wild animals, including humans. While various *Leptospira* strains have been isolated in cattle, their reproductive impact remains unknown. This study aimed to evaluate the dynamics of *Leptospira* spp. infection in pregnant cows through both serological and molecular diagnostic methods. Additionally, the impact of leptospirosis on reproductive disorders (early losses and abortions) in beef cattle was assessed, and other domestic species in contact with cattle were studied as potential disease transmitters. A total of 31 herds distributed across Uruguay were evaluated. Three sampling points were conducted on each farm: at pregnancy diagnosis via ultrasound (T1), during the second trimester of gestation (T2), and post-calving (T3). At T1, ten cows that were diagnosed as non-pregnant were randomly sampled, and 25 pregnant cows with gestation less than three months were selected for follow-up in subsequent samplings. Blood and urine samples were collected from each cow at each sampling point, and a survey was conducted with the farm's private veterinarian. Additionally, blood samples were collected once from up to 30 sheep, up to 10 horses, depending on the number present on the farm, and all dogs in contact with cattle. Blood samples were analyzed serologically using the microagglutination technique, and urine samples were analyzed for bacterial isolation and qPCR. From 2020 to 2022, a total of 778 pregnant cows and 303 non-pregnant cows from 31 farms were sampled. Blood samples were also collected from 723 sheep, 203 horses, and 93 dogs. The most prevalent serogroups in cattle were Sejroe (33,6%) and Pomona (4,2%). A total of 31,2% of cows were qPCR-positive in the first sampling, while only 3,21% were positive across all three samplings. Bacterial isolation resulted in 51 *Leptospira* strains belonging to four species: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, and *L. santarosai*. An association was found between infertility and the Sejroe serogroup (OR=1.31) and with bacterial shedding levels in urine (10–100 *Leptospira* copies/mL of urine: OR=1.4; >100 copies/mL: OR=2.34). Additionally, an

association between the Pomona serogroup and abortion in cows was identified (OR=8,06). A correlation was observed between intrafarm seroprevalence of the Sejroe serogroup in cattle and seroprevalence in sheep and horses, suggesting their involvement in the bacteria's epidemiological cycle. The study revealed widespread *Leptospira* dissemination on the evaluated farms, high levels of bacterial shedding, and significant strain variability. The association between leptospirosis and reproductive disorders suggests that this pathogen negatively impacts reproductive performance in cattle herds, highlighting the importance of disease control to optimize farm productivity. Given the widespread distribution of the bacteria not only in cattle but also in other domestic species, the significant strain variability, and the complexity of the epidemiological cycle, controlling leptospirosis and promoting public health education are crucial.

## Antecedentes Específicos

### INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana de distribución mundial que afecta tanto a animales domésticos como silvestres, e incluso a humanos. Es causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira spp.*, cuyas especies patógenas tienen un amplio potencial para persistir en el ambiente y transmitirse entre especies (Faine *et al.*, 1999; Adler, 2011). Su incidencia es mayor en países tropicales y templados, donde las condiciones de humedad y temperatura favorecen la supervivencia de la bacteria en el ambiente, aumentando así las posibilidades de transmisión (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001; Muñoz *et al.*, 2020). Teóricamente, todas las especies de mamíferos pueden ser portadores renales y reservorios de algún serovar de *Leptospira*, lo que explica su amplia diseminación (Davignon *et al.*, 2023).

La *Leptospira spp.* pertenece a la familia *Leptospiraceae* y es una espiroqueta aeróbica Gram negativa, con una morfología espiralada, esbelta y de gran movilidad, que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Estas bacterias tienen un diámetro promedio de 0,1  $\mu\text{m}$  y una longitud de 6-20  $\mu\text{m}$  (Carleton *et al.*, 1979; Goldstein y Charon, 1988, 1990; Faine *et al.*, 1999). Debido a su delgada estructura, su visualización requiere el uso de microscopía de campo oscuro (Alder, 2015).

La clasificación de *Leptospira* se realiza utilizando dos sistemas: fenotípico y genotípico, que en ocasiones difieren. El sistema fenotípico clasifica las cepas en patógenas (*Leptospira interrogans sensu lato*) y saprófitas (*Leptospira biflexa sensu lato*). Esta clasificación se basa en el serovar, una unidad taxonómica definida por características antigénicas detectadas mediante la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) (Levett, 2001, 2015; Bharti *et al.*, 2003). Los serovares con características antigénicas similares se agrupan en serogrupos, los cuales no tienen valor taxonómico formal, pero son fundamentales para entender la dinámica epidemiológica de la enfermedad. A nivel práctico, se continúa utilizando la clasificación fenotípica

debido a la relación entre serogrupos/serovares adaptados y no adaptados al huésped, lo que define los estados de portadores crónicos de la enfermedad (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001, 2015; Ko *et al.*, 2009).

Actualmente, se reconocen 22 especies de *Leptospira*, clasificadas en tres grupos según su patogenicidad: patógenas, no patógenas (o saprofitas) e intermedias (Fouts *et al.*, 2016). Las especies patógenas están compuestas por más de 300 serovares, agrupados en 25 serogrupos según la similitud antigénica de sus lipopolisacáridos (LPS) de superficie (Cerqueira y Picardeau, 2009; Alder y de la Peña, 2010; Evangelista y Coburn, 2010). Esta clasificación es esencial, ya que los LPS, con su capa externa en la membrana celular, juegan un papel clave en la virulencia y la patogenicidad de estas bacterias (Alder, 2015).

Un aspecto distintivo de *Leptospira* es su habilidad para sobrevivir en el ambiente mediante la formación de biofilms, lo que permite una transmisión interespecie eficiente. Dependiendo de las condiciones ambientales, las leptospirosas pueden persistir en el ambiente de 5 a 193 días, especialmente en presencia de alta humedad (Davignon *et al.*, 2023). Esta capacidad, junto con la habilidad de la bacteria para ajustarse a cambios osmóticos y mantener su motilidad en diferentes medios, contribuye a su virulencia y éxito en la invasión de tejidos del hospedador (Lambert *et al.*, 2012; Takabe *et al.*, 2013).

Las Leptospiras patógenas pueden causar infecciones agudas o crónicas, afectando tanto a humanos como a diversas especies animales, entre ellas bovinos, ovinos, suinos y equinos, lo que genera pérdidas significativas en la producción pecuaria debido a problemas de eficiencia reproductiva y necesidad de refugio de los animales enfermos (Adler, 2015). Se ha observado una estrecha relación entre ciertos serovares y especies animales, clasificándolos en serovares de mantenimiento, que perpetúan la infección en una población hospedadora, y serovares incidentales, asociados a infecciones del tipo incidental. Esta relación es influenciada por la respuesta inmune del hospedador, lo que permite que algunos serovares adaptados sean reconocidos como células inmunes innatas en los portadores renales, lo que facilita su eliminación rápida de la sangre y los órganos, excepto en los túbulos

renales (Davignon *et al.*, 2023).

Considerada una enfermedad desatendida y subnotificada, a nivel mundial la leptospirosis es responsable de 1,03 millones de casos humanos anuales y de unas 58,900 muertes (Costa *et al.*, 2015). En humanos, la enfermedad se conoce como síndrome de Weil, descrito por primera vez en 1886, considerándose una enfermedad ocupacional, teniendo mayor riesgo de infección aquellos que trabajan con animales o en contacto con aguas contaminadas (Ko *et al.*, 2009; Adler, 2015).

La leptospirosis representa un desafío tanto para la salud pública como para el sector pecuario, ya que su transmisión se facilita por la capacidad de la *Leptospira* para persistir en el ambiente y su amplia gama de huéspedes, lo que subraya la importancia de estudios epidemiológicos que orienten medidas de control efectivas.

## **TRANSMISIÓN Y PATOGÉNICIA**

Los niveles de transmisión y el desarrollo de la enfermedad en infecciones por *Leptospira* van a variar ampliamente dependiendo de múltiples factores. Uno de los más importantes es el tipo de serovar infectivo. Como se mencionó, existen los serovares de mantenimiento y los incidentales (Davignon *et al.*, 2023).

Las infecciones incidentales están asociadas a fases agudas de la enfermedad (sobre todo en animales jóvenes), con una excreción renal de corta duración. En cambio, los serovares de mantenimiento, adaptados al huésped, pueden alojarse en los riñones durante años, con la consiguiente eliminación de la bacteria por la orina, y generalmente causan pocos efectos clínicos, salvo en condiciones de inmunosupresión. La infección puede ocurrir a través de mucosas, como las de ojos, boca, nariz o el tracto genital, y también se ha confirmado en predadores mediante la vía oral. En algunos casos, se ha registrado transmisión vertical (Adler, 2015).

En casos de leptospirosis aguda, la inmunidad predominante es de tipo humoral, mientras que, en la leptospirosis crónica, como en la infección por *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo en bovinos, la respuesta inmune es de tipo celular (T-helper tipo 1). Esto explica por qué las infecciones crónicas presentan niveles bajos de aglutinación de anticuerpos. Además, se ha identificado que los lipopolisacáridos (LPS) juegan un rol crucial en la patogenicidad de la bacteria y en la respuesta inmune generada en animales infectados. Los LPS, especialmente el componente polisacárido, que varía entre serovares, son responsables de que la inmunidad humoral sea específica al serovar (Balks *et al.*, 2013).

Tras la infección, la *Leptospira* genera una bacteriemia que puede durar hasta una semana. La aparición de anticuerpos circulantes facilita la eliminación de las *Leptospiras* de la circulación y tejidos, pero estas se alojan en las células epiteliales de los túbulos renales, convirtiendo a los animales en portadores crónicos y diseminadores de la bacteria a través de la orina, especialmente en condiciones de orina alcalina (Alder y de la Peña, 2010). La producción de anticuerpos específicos inicia alrededor de los 10-14 días, alcanzando un pico entre las 3-6 semanas y luego disminuyendo progresivamente.

Aunque la *Leptospira* se aloja principalmente en los riñones de su huésped natural, también se encuentra en el tracto reproductivo, siendo excretada a través de fluidos provenientes de abortos (Hartskeerl *et al.*, 2011; Loureiro y Lilenbaum, 2020). Cuando la bacteria se aloja en útero pueden causar problemas reproductivos, como abortos y nacimientos prematuros (Loureiro y Lilenbaum, 2020). También se ha reportado su excreción por leche (Adler, 2015).

## HOSPEDEROS

La leptospirosis afecta a una amplia gama de animales domésticos y silvestres, incluyendo mamíferos, aves, anfibios y reptiles. Aunque algunos animales, especialmente los silvestres, pueden estar infectados sin mostrar síntomas, su rol en la epidemiología de la leptospirosis es relevante para la

transmisión y diseminación en diferentes ecosistemas (Faine *et al.*, 1999). Investigadores han identificado numerosas especies animales como hospedadoras de *Leptospiras*, considerando los aproximadamente 300 serotipos reconocidos hasta la actualidad (Levett, 2015; Cerqueira y Picardeau, 2009). Sin embargo, solo un pequeño conjunto de serovares es endémico en cada región o país específico (Adler, 2015). En un ecosistema dado, el papel de cada especie animal susceptible se divide en dos categorías principales: hospedadores de mantenimiento (adaptados) e incidentales (no adaptados) (Ellis, 2015; Levett, 2001).

En Latinoamérica, se han realizado múltiples investigaciones en especies domésticas (Pinto *et al.*, 2017), en donde se reporta no solo desarrollo de la forma aguda de la enfermedad (Hamond *et al.*, 2024), sino que también afecciones más del tipo crónica, incluyendo las afecciones reproductivas (Hamond *et al.*, 2013; Polle *et al.*, 2014; Tonin *et al.*, 2015). Los ovinos, suelen ser menos susceptibles que los bovinos, pero también se ha reportado la ocurrencia de infertilidad, abortos, mortalidad perinatal y nacimientos de animales débiles o muertos. Se lo ha visto asociada a infecciones por los serovares Hardjo y Wolffi; cuando existe el co-pastoreo con bovinos (Tonin *et al.*, 2015); y con *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki (Hamond *et al.*, 2024).

Los equinos, por su parte, pueden desarrollar leptospirosis de forma asintomática o presentar uveítis recurrente en infecciones crónicas, siendo el serovar Bratislava el más común debido a su adaptación al huésped (Polle *et al.*, 2014). Sin embargo, en áreas urbanas donde los equinos pueden estar en contacto con roedores, el serovar Icterohaemorrhagiae es el más prevalente, lo cual subraya su papel en la transmisión de la enfermedad en zonas de contacto cercano entre especies (Hamond *et al.*, 2013).

Por su parte, los caninos presentan una particular adaptación al serogrupo Canicola, lo que permite una transmisión sin signos clínicos evidentes. No obstante, cuando los caninos se exponen a serovares no adaptados, pueden

desarrollar signos clínicos graves, como insuficiencia hepática y/o renal. Los suinos se saben actúan como portadores de los serovares Pomona y Australis, generalmente con infecciones subclínicas, aunque el contacto con serovares no adaptados puede resultar en abortos y otras complicaciones reproductivas (Pinto *et al.*, 2017).

Si bien la infección de *Leptospira* en gatos es rara, se han reportado casos de gatos con sintomatología infectados con Leptospirosis y vinculados a rodeos lecheros. Los sistemas intensivos como son la producción lechera suelen promover la transmisión de la enfermedad inter especie (Ojeda *et al.*, 2018).

En animales silvestres, el serogrupo Icterohaemorrhagiae es predominante en mamíferos en América Latina, siendo roedores como la rata marrón (*Rattus norvegicus*) y la rata negra (*Rattus rattus*) importantes reservorios urbanos de la enfermedad (Picardeau, 2013; Hamond *et al.*, 2014). La prevalencia de la infección en animales silvestres en América Latina varía entre 0% y 52%, con los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Australis en mamíferos, y Sejroe en reptiles como más seroprevalentes (Vieira *et al.*, 2017).

## **LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS**

La leptospirosis en bovinos puede manifestarse de forma subclínica, aguda o crónica, siendo la presentación subclínica la más frecuente. La gravedad de la infección está influenciada por diversos factores como la dosis infectiva, el serovar involucrado, y el estado fisiológico e inmunitario del animal (Ellis, 2015). Cuando el serovar está adaptado al huésped, como es el caso del serovar Hardjo en bovinos, la infección tiende a ser subclínica o crónica. Esta última forma es particularmente preocupante para los productores ganaderos debido a su impacto económico, ya que puede causar abortos, infertilidad, disminución en la producción láctea, y nacimiento de terneros débiles o prematuros (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Hardjo es la principal serovar de mantenimiento en el ganado bovino y se presenta en dos biotipos: Hardjobovis (*L. borgpetersenii*) y Hardjoprajitno (*L.*

*interrogans*), ambos pertenecientes al serogrupo Sejroe. En infecciones endémicas dentro de un rebaño, entre el 30% y el 40% de los animales pueden estar eliminando la bacteria a través de la orina, convirtiéndose en reservorios que perpetúan la infección en el grupo (Adler, 2015). La transmisión también puede ser venérea, ya que ambas cepas tienen la capacidad de colonizar y persistir en el tracto genital de vacas y toros infectados (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

La infección crónica por Hardjo en bovinos es la que causa mayores pérdidas económicas. Los síntomas incluyen pérdidas embrionarias tempranas, abortos, mortinatos, nacimiento de terneros débiles y bajo peso al nacer (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Los abortos ocurren generalmente en el último tercio de la gestación, entre la primera y tercera semana posterior a la infección, y hasta el 20% de los animales que abortan pueden presentar retención placentaria (Faine *et al.*, 1999). Los fetos abortados suelen presentar autólisis, sin signos patognomónicos específicos. En algunos países, como Estados Unidos, la leptospirosis es reconocida como una causa importante de fallas reproductivas en bovinos (Grooms y Bolin, 2005). Sin embargo, en regiones como Australia y Nueva Zelanda, la infección por Hardjo no siempre está asociada con infertilidad; aunque estudios recientes sugieren que esta situación podría estar cambiando (Sanhueza *et al.*, 2013).

La forma aguda de la leptospirosis en bovinos es menos común y ocurre principalmente en animales jóvenes, siendo causada por serovares incidentales como Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica y Tarassovi. Esta forma aguda se caracteriza por fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, anorexia, y en casos graves puede incluir meningitis y muerte (Adler, 2015). Las infecciones agudas por serovares no adaptadas al huésped, como Pomona, también pueden llevar a pérdidas productivas en los predios, debido a problemas reproductivos y de crecimiento en los animales, pudiendo incluso resultar en brotes de abortos masivos conocidos como "tormentas de abortos" (Bolin, 2003).

Las infecciones endémicas en rebaños bovinos pueden afectar también la producción láctea. La infección con Hardjo en vacas en lactación puede llevar a agalactia, aunque en la mayoría de los casos esta se presenta de forma subclínica (Adler, 2015). Otros síntomas clínicos incluyen fiebre temporal, anorexia, conjuntivitis, reducción drástica en la producción de leche, y con frecuencia, mastitis. Estos síntomas pueden variar de acuerdo con el sistema de cría y el biotipo de Hardjo presente en el rebaño (Laven, 2012).

La leptospirosis representa una enfermedad de alto impacto económico en la producción bovina global debido a sus efectos adversos en la reproducción y la producción de leche. El serovar Hardjo, adaptada al bovino, se identifica como una de las principales causas de leptospirosis en estos animales, lo que subraya la importancia de implementar estrategias de manejo y prevención para minimizar las pérdidas asociadas.

### Epidemiología

La leptospirosis presenta tres ciclos epidemiológicos clásicos: el rural, el urbano y el salvaje (Faine *et al.*, 2000). El punto central en la epidemiología de esta enfermedad es el portador renal que excreta la bacteria al ambiente, propagándola en el ecosistema (Alder, 2015). Aunque los serovares de *Leptospira* pueden adaptarse a múltiples huéspedes, cada huésped puede infectarse con diversos serovares, lo que mantiene un ciclo dinámico y complejo (Hartskeerl *et al.*, 2011). Esta diversidad y adaptabilidad se reflejan en diferentes regiones y especies animales, y en la prevalencia de ciertos serogrupos y serovares (Namita *et al.*, 2008).

La leptospirosis ha sido detectada en todos los continentes, exceptuando las regiones polares, y afecta a una amplia variedad de especies animales (Alder, 2015). En áreas tropicales, especialmente en ecosistemas insulares, pueden ocurrir brotes importantes después de períodos de lluvias intensas e inundaciones. Los serogrupos de mayor circulación en las islas del Pacífico han sido reportados como Icterohaemorrhagiae, Pomona, Australis y Sejroe (Guernier *et al.*, 2018). Asimismo, en Latinoamérica, una revisión sistemática

mostró la prevalencia de serogrupos específicos en diferentes especies: Canicola en caninos e Icterohaemorrhagiae en suinos y equinos (Pinto *et al.*, 2017). Un estudio en el sur de Brasil identificó los serogrupos más prevalentes, como Hardjo en bovinos y Bratislava en equinos (Jorge *et al.*, 2017).

En un estudio donde se evaluaron factores de riesgo vinculados a la leptospirosis, se observó que la enfermedad estaba asociada con el acceso de perros a las pasturas y la exposición del alimento a roedores. También se encontró una relación entre seropositividad y afecciones reproductivas, con vacas seropositivas que presentaban un 8% más de probabilidades de desarrollar problemas reproductivos, tales como abortos, repetición de celo y momificación fetal. En este estudio, el 6.4% de los animales resultaron seropositivos a *Leptospira spp.*, siendo los serogrupos Sejroe y Pomona los más prevalentes. Este nivel de prevalencia se considera relativamente bajo en comparación con otros países de América Latina, donde las prevalencias reportadas oscilan entre el 16% y el 80%. Además, se halló que los animales con acceso a ríos tenían mayor probabilidad de ser seropositivos (OR=4,45), al igual que aquellos provenientes de predios más antiguos (OR=3,49), sugiriendo que las infecciones crónicas podrían ser más frecuentes en estos predios (Fávero *et al.*, 2017).

En Brasil, otro estudio de seroprevalencia en bovinos, ovinos y caprinos en 33 predios reportó una alta seroprevalencia en bovinos (50,5%), con los serogrupos Sejroe, Icterohaemorrhagiae y Pomona como los más comunes. Los factores de riesgo en este caso incluyeron el acceso a cursos de agua naturales, alimentación basada en pastura y la falta de asesoramiento veterinario, lo cual aumentaba la probabilidad de infección en bovinos (Campos *et al.*, 2017). Otro estudio en Brasil también encontró que la seropositividad en caprinos y ovinos aumentaba con la edad, siendo Icterohaemorrhagiae el serogrupo más prevalente en ovinos y Australis en perros (dos Santo *et al.*, 2017).

De manera general, los factores de riesgo más asociados a la leptospirosis son los relacionados con la exposición al agua y a los roedores. El contacto de bovinos con roedores se ha descrito como un potencial factor de riesgo, mientras que el control de estos roedores se asocia con un factor de protección. Sin embargo, estudios realizados en todo el mundo han señalado que los perros no representan un riesgo significativo para la transmisión de leptospirosis en bovinos, ya que el contacto entre ambas especies suele ser bajo, limitándose a situaciones esporádicas y principalmente en áreas residenciales. Incluso hay investigaciones que los identifican como un posible factor de protección, aunque estos estudios generalmente tienen un bajo número de muestras o identifican la presencia de perros como un posible factor de confusión (Mwachui *et al.*, 2015).

La asociación entre factores de riesgo y leptospirosis también depende del tipo de serovar circulante. En bovinos, los factores de riesgo asociados con el serovar Hardjo incluyen el tamaño de los rebaños, el co-pastoreo con ovinos, acceso a agua contaminada y el uso de toros infectados para la monta natural (Alder, 2015). Una revisión en Europa mostró que los serogrupos más comunes en ganado bovino son Sejroe, Australis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona, siendo el aborto y los trastornos de fertilidad las manifestaciones clínicas más frecuentes, generalmente asociadas a infecciones crónicas (Sohm *et al.*, 2023).

La introducción de la infección en los rebaños suele ocurrir también a través de la compra de animales infectados (Laven, 2012; Suanes *et al.*, 2024). Predios con mayor nivel de tecnificación tienden a presentar infecciones por serovares adaptados al huésped, mientras que los de menor desarrollo técnico tienen mayor prevalencia de infecciones incidentales (Martins y Lilenbaum, 2017). En países como Japón, se ha observado que la importación de animales de otras regiones aumenta el riesgo de infección (Miyama *et al.*, 2018). Otro factor de riesgo importante es el co-pastoreo con otras especies susceptibles, como cerdos, que incrementa la probabilidad de infecciones por serovares como Pomona y Bratislava (Lilenbaum *et al.*, 2003).

La relación entre las precipitaciones y la leptospirosis puede deberse tanto a la mayor supervivencia de la bacteria en ambientes húmedos como a un mayor contacto de humanos y animales con agua contaminada y una mayor proliferación de roedores. Sin embargo, un estudio en Brasil no encontró una asociación directa entre lluvias y prevalencia de infecciones, posiblemente debido a la constancia de precipitaciones en la región estudiada (Jorge *et al.*, 2017).

Finalmente, estudios demuestran que los factores de riesgo asociados a la leptospirosis en explotaciones ganaderas son variados y dependen de las prácticas de manejo. Rebaños con control veterinario frecuente muestran menor seroprevalencia en comparación con aquellos sin asistencia veterinaria (Lilenbaum *et al.*, 2003). Estos hallazgos resaltan la importancia de identificar los serovares predominantes para desarrollar estrategias de control adecuadas a cada región y especie (Jorge *et al.*, 2017).

### Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis es indispensable, ya que la enfermedad en la mayoría de los animales se presenta de forma subclínica o con signos muy inespecíficos. Para confirmar la presencia de *Leptospira spp.*, se requiere el apoyo de pruebas de laboratorio. Los métodos de diagnóstico se dividen en dos grandes categorías: los directos, que detectan la presencia de la bacteria en tejidos o fluidos corporales, y los indirectos, que identifican anticuerpos específicos en suero, siendo estos últimos los más utilizados en animales vivos (Alder y de la Peña, 2010; Alder, 2015). La elección de la técnica depende no solo de los recursos disponibles en el laboratorio, sino también de la etapa de infección en el animal, siendo el MAT la prueba de referencia (OMSA, 2022).

#### - Métodos Directos

Los métodos directos de diagnóstico buscan identificar la presencia de *Leptospiras* en fluidos corporales u órganos de animales infectados. Estas

pruebas son especialmente útiles durante la fase inicial de bacteriemia, en fetos abortados y en fluidos corporales como son orina, flujo vaginal, semen, y leche (Alder, 2015). No obstante, la efectividad de estos métodos se reduce en animales en estado de portador crónico, ya que la excreción de la bacteria suele ser intermitente y puede ser afectada por tratamientos antibióticos previos.

Entre las pruebas directas se incluyen:

- Microscopía de Campo Oscuro (MCO): Este método permite visualizar las *Leptospiras* en muestras de orina o sangre, debido a la forma y movimiento característicos de la bacteria. Sin embargo, su sensibilidad es baja, requiriéndose al menos  $10^4$  organismos/mL para una detección fiable (Picardeau, 2013).
- Cultivo y aislamiento bacteriano: Aunque es el único método con una especificidad del 100%, su sensibilidad es limitada y el proceso es laborioso, requiriendo hasta seis meses para obtener resultados, lo cual dificulta su uso en el diagnóstico rápido de la enfermedad (Alder, 2015; OMSA, 2021). Aun así, el aislamiento es importante en estudios epidemiológicos y para identificar los serovares circulantes en una región.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): La PCR, especialmente en tiempo real, es una técnica más rápida y sensible para el diagnóstico temprano, ya que no requiere organismos viables en la muestra. Sin embargo, un resultado positivo solo confirma la presencia de *Leptospiras* patógenas sin identificar el serovar específico (Picardeau, 2013; Alder, 2015).

La demostración de *Leptospiras* en órganos fetales (como riñón o hígado) se considera evidencia de infección activa en la madre. Sin embargo, la presencia de la bacteria en el tejido placentario sin afectación fetal no debe interpretarse necesariamente como infección del feto (Alder, 2015).

- Métodos Indirectos

Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos específicos de *Leptospira spp.* en el suero del animal. La prueba de referencia es la Prueba de Microscopia de Aglutinación (MAT), desarrollada en 1918 y ampliamente utilizada por su alta especificidad. El MAT tiene varias limitaciones: no distingue entre anticuerpos IgM e IgG (Balks *et al.*, 2013), produce reacciones cruzadas entre serogrupos, y no permite diferenciar entre infecciones naturales y anticuerpos inducidos por vacunas comerciales (Pinto *et al.*, 2017; Hamond *et al.*, 2014). La interpretación de los resultados debe considerar que el serogrupo con el título de anticuerpos más alto es el más probable agente infeccioso.

El MAT es especialmente útil para estudios epidemiológicos y control a nivel de rodeo, mientras que su interpretación a nivel individual es compleja y no se correlaciona siempre con el estado de portador del animal (Hamond *et al.*, 2014). La prueba se realiza mediante diluciones seriadas de suero con un panel de antígenos de distintos serogrupos y requiere la observación en microscopio de campo oscuro para evaluar la aglutinación. Los títulos de corte óptimos para MAT son debatidos entre investigadores y pueden variar según la región y el propósito del diagnóstico, algunos sugieren que debe ser 1/100, mientras que en otros establecen que para zonas endémicas debe ser 1/200 (Martins y Lilenbaum, 2013). El punto de corte también puede depender del objetivo del estudio, si el objetivo es detectar el contacto con el agente deben utilizarse títulos de corte bajos, pero si se busca asociar los títulos con presencia de signos clínicos o performance reproductiva será necesario utilizar títulos de corte más altos (Pinto *et al.*, 2017).

Para mejorar la sensibilidad del MAT, se recomienda utilizar serogrupos nativos, ya que estos reflejan mejor la epidemiología local. El panel de antígenos debe incluir serovares representativos de cada serogrupo y actualizarse en función de estudios epidemiológicos (Verma *et al.*, 2013).

A pesar de las ventajas del MAT, su complejidad ha impulsado el desarrollo de pruebas serológicas alternativas, como ELISA, IFAT y IHA, que detectan

anticuerpos IgM e IgG específicos para *Leptospira spp.* No obstante, la validación de estos kits frente al MAT sigue siendo un desafío, dada la variabilidad en la sensibilidad del MAT en infecciones crónicas (Alder, 2015).

### Control

El control de la leptospirosis en bovinos se basa en un enfoque trinomial que incluye terapia con antibióticos, vacunación y control ambiental, cada uno de estos componentes abordando distintos aspectos de la transmisión y persistencia de la enfermedad. El uso de antibióticos, especialmente estreptomycin, es una estrategia clave en este plan, ya que permite reducir el número de animales infectados en un rodeo afectado, disminuyendo así la excreción urinaria de *Leptospira* y limitando su propagación entre animales. En particular, se recomienda la administración de una dosis de 25 mg/kg de estreptomycin por vía intramuscular para eliminar el estado de portador renal; sin embargo, en infecciones crónicas causadas por serovares adaptados al huésped, es necesario administrar esta dosis una o dos veces al día durante tres días para lograr la eficacia deseada. Otros antibióticos, como oxitetraciclina, tulatromicina y ceftiofur, también han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la leptospirosis (Martins y Lilenbaum, 2017).

Aunque el uso de antibióticos puede eliminar el estado de portador, no evita posibles reinfecciones (Martins y Lilenbaum, 2017). Por esta razón, la vacunación es fundamental para complementar el tratamiento antibiótico y brindar inmunidad contra la infección. Sin embargo, las vacunas actuales presentan ciertas limitaciones, ya que suelen ser específicas de serovar y generalmente no previenen la transmisión de la enfermedad a otros animales (Bazaglia-Sonada *et al.*, 2018). Aunque se ha demostrado que algunos tipos de vacunas protegen contra múltiples serovares dentro del mismo serogrupo, la inmunidad inducida es limitada en el tiempo, y no se ha logrado una protección completa contra la reinfección. Las vacunas que contienen proteínas Leptospirales similares a la inmunoglobulina, como LigA y LigB, han mostrado un buen nivel de protección en modelos animales, siendo estas una

opción prometedora en el desarrollo de vacunas más efectivas (Martins y Lilenbaum, 2017). Las bacterinas de célula completa siguen siendo la mejor opción disponible para controlar la leptospirosis en bovinos, aunque en vacunas multivalentes, no se observan títulos de anticuerpos medibles mediante la técnica MAT (Balks *et al.*, 2013).

Además, las medidas de control ambiental juegan un rol importante en la prevención de la transmisión de leptospirosis, tanto de manera directa como indirecta. Las estrategias de manejo ambiental deben adaptarse a las características del predio, considerando factores como la cantidad de animales, el área geográfica, la especie, el serovar predominante y su huésped de mantenimiento, así como las formas de transmisión y factores de riesgo específicos (Alder, 2015). En predios con programas de control estrictos, se recomienda implementar cuarentena y tratamiento antibiótico a todos los animales que ingresan al rodeo, como medida preventiva adicional para evitar la introducción de nuevos focos de infección (Martins y Lilenbaum, 2017).

En general, el principal objetivo de los programas de vacunación es reducir las pérdidas reproductivas que causa la leptospirosis en los rodeos, más que erradicar completamente la infección (Sonada *et al.*, 2018). A pesar de las limitaciones actuales en términos de duración de la inmunidad y efectividad en la prevención de la transmisión, la combinación de estos métodos de control ofrece una estrategia integral para reducir el impacto de la leptospirosis en la producción bovina.

## **ANTECEDENTES EN URUGUAY**

La leptospirosis en Uruguay ha sido objeto de estudio desde finales de la década de 1950. En 1959, el Dr. Raimundo Leaniz y colaboradores realizaron los primeros estudios serológicos de la enfermedad en el país. Años después, en 1965, el Dr. Roberto Caffarena y su equipo llevaron a cabo los primeros estudios de seroprevalencia en ganado bovino, encontrando una prevalencia del 20%. Un año más tarde, en 1966, el Dr. Cachione y colaboradores

reportaron una seroprevalencia del 24% en bovinos. Ya en 1998, el Dr. Gil y su equipo llevaron a cabo un estudio similar en ganado bovino lechero, hallando una seroprevalencia del 14%.

En el ámbito de la producción de carne, Repiso *et al.* (2005) realizaron un estudio vinculado a enfermedades reproductivas, en el que se incluyó la leptospirosis. En esta investigación, se estimó una seroprevalencia de 38,5% en el ganado de carne. En 2003, Gil y su equipo realizaron un monitoreo de salud animal en la cuenca lechera sur del Uruguay, que incluye los departamentos de San José, Colonia y Florida, observando que la seroprevalencia variaba entre un 11% y un 50%, dependiendo de la región.

Un estudio de seroprevalencia más reciente realizado en 2015 en ganado lechero analizó además factores de riesgo asociados a la infección. La seroprevalencia en bovinos lecheros fue de 27,80% a nivel individual y de 86,92% a nivel de rebaño. En este estudio, se confirmó el predominio de los serogrupos Sejroe y Pomona en los rebaños lecheros uruguayos, aunque también se identificaron infecciones esporádicas con *Leptospiras* incidentales. El tamaño de los rebaños y la compra de animales de reposición fueron factores de riesgo asociados con la infección a nivel predial en los establecimientos lecheros (Suanes *et al.*, 2024). En el caso de los rodeos de carne, la seroprevalencia a nivel individual fue del 23,38%, y a nivel de rebaño alcanzó el 69,22%. Al igual que en los rebaños lecheros, se observó un predominio de los serogrupos Sejroe y Pomona, y se detectó una tendencia a que la prevalencia aumentara con el tamaño del rebaño. Estos estudios serológicos han confirmado que la exposición a *Leptospira spp.* es endémica en los rebaños uruguayos.

A partir de 2014, se han realizado esfuerzos para aislar cepas autóctonas de *Leptospira* en bovinos, a través de proyectos financiados por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) en colaboración con varias instituciones, como el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), el Instituto Pasteur de Montevideo (IPM), DILAVE, y la Facultad de Medicina

(Instituto de Higiene). Se logró aislar 40 cepas de *Leptospira spp.* de 48 predios, tanto de leche como de carne, con un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, estos aislamientos pertenecieron a *L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki (20 cepas), *L. interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola (1 cepa), *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe serovar Hardjo (10 cepas) y *L. noguchii* (9 cepas). Esta investigación reporta que el 20% de los animales muestreados estaban eliminando *Leptospiras* patógenas por medio de la orina (Zarantonelli *et al.*, 2018). El aislamiento e identificación de las cepas circulantes en un país es indispensable para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad y poder implementar medidas de control más adecuadas, pero se desconoce si estas serovares circulantes realmente causan afecciones reproductivas en los bovinos.

## REFERENCIAS

1. Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. <http://www.springer.com/series/82>
2. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296.
3. Adler, B., Lo, M., Seemann, T., & Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Veterinary microbiology*, 153(1-2), 73-81.
4. Balks, E., Gyra, H., Kobe, B., Cussler, K., & Werner, E. (2013). Development and validation of a serological potency test for the release of *Leptospira* vaccines—Requirements in the European Union. *Biologicals*, 41(5), 325-329.
5. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.
6. Bolin Carol. (2003) Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference March 12-14, 2003 Reno, NV—158.

7. Caffarena, R. M., Cacchione, R. A., Cascelli, E. S., & Martinez, E. S. (1971). Developments in leptospirosis in Uruguay.
8. Campos, Â. P., Miranda, D. F. H., Rodrigues, H. W. S., da Silva Carneiro Lustosa, M., Martins, G. H. C., Mineiro, A. L. B. B., Castro, V., Azevedo, S. S., & de Sousa Silva, S. M. M. (2017). Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(5), 899–907. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1255-2>
9. Carleton O, Charon NW, Allender P, O'brien S. (1979) Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 137(3): 1413-1416.
10. Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(5), 760–768.
- Wilson-Welder, J. H., Alt, D. P., Nally, J. E., & Olsen, S. C. (2021). Bovine Immune Response to Vaccination and Infection with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. *mSphere*, 6(2),
11. 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.
12. Davignon, G., Cagliero, J., Guentas, L., Bierque, E., Genthon, P., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Kainiu, M., Laporte-Magoni, C., Picardeau, M., Selmaoui-Folcher, N., Soupé-Gilbert, M. E., Tramier, C., Vilanova, J., Wijesuriya, K., Thibeaux, R., & Goarant, C. (2023). Leptospirosis: toward a better understanding of the environmental lifestyle of *Leptospira*. In *Frontiers in Water* (Vol. 5). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/frwa.2023.1195094>
13. dos Santos, L. F., Guimarães, M. F., de Souza, G. O., da Silva, I. W. G., Santos, J. R., Azevedo, S. S., Labruna, M. B., Heinemann, M. B., &

- Horta, M. C. (2017). Seroepidemiological survey on *Leptospira spp.* infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(8), 1715–1722. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1382-9>
14. Ellis, W. A. (2015). Animal leptospirosis. *Leptospira* and leptospirosis, 99-137.
  15. Evangelista KV, Coburn J. (2010) *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, 5(9): 1413-1425.
  16. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. (1999) Melbourne, Australia, MediSci.
  17. Fávero, J. F., de Araújo, H. L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A. A., Baldissera, M. D., Stefani, L. M., & da Silva, A. S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial Pathogenesis*, 107, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>
  18. Fouts DE, Matthias M A, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, Bulach D, Buschiazzi A, Chang Y, Galloway RI, Haake DA, 2, Haft DH, Hartskeerl R, Ko AI, Levett PN, Matsunaga J, Mechaly AE, Monk JM, Nascimento ALT, Nelson KE, Palsson B, Peacock SJ, Picardeau M, Ricaldi JN, Thaipandungpanit J, Wunder EA Jr, Yang XF, Zhang J, Vinetz JM. (2016) What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2): e0004403.
  19. Gil A.D. y Samartino L.E. (2000) Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. FAO: PE1/211 - AGAH-407
  20. Goldstein SF, Charon NW. (1988) Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 9(2): 101-110.

21. Grooms, D. L., & Bolin, C. A. (2005). Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira* spp. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21(2), 463-472.
22. Guernier, V., Goarant, C., Benschop, J., & Lau, C. L. (2018). A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006503>
23. Hamond, C., Martins, G., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2013). The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. *Epidemiology and Infection*, 141(1), 33–35. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000416>
24. Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A. P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Veterinary research communications*, 38, 81-85.
25. Hamond, C., Silveira, C. S., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Salaberry, X., Aráoz, V., Costa, R. A., Rivero, R., Giannitti, F., & Zarantonelli, L. (2024). Infección aguda por *Leptospira interrogans* serovar kennewicki en corderos.
26. Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M., & Ellis, W. A. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 17, Issue 4, pp. 494–501). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>
27. Jorge S, Schuch RA, de Oliveira NR, da Cunha CEP, Gomes CK, Oliveira TL, Rizzi C, Qadan AF, Pacce VD, Recuero ALC, Dellagostin OA, Brod CS. (2017) Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 18: 46-52.

28. Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(10), 736–747.
29. Lambert A, Picardeau M, Haake DA, Sermiswan RW, Srikrum A, Adler B, Murray G. (2012) FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence, but not required for the formation of flagella sheath. *Infection and Immunity*, 80 (6): 2019- 2025.
30. Laven, R. (2012). Leptospirosis. *Livestock*, 17(2), 31–31. <https://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2011.00055.x>
31. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology*, 14(2), 296–326.
32. Lilenbaum W1, Souza GN. (2003) Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Vet Sci*. Dec;75 (3):249-51.
33. Lilenbaum, W., & Martins, G. (2014). Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and emerging diseases*, 61, 63-68.
34. Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47.
35. Martins, G., & Lilenbaum, W. (2017). Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 112, pp. 156–160). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021>
36. Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., Urushiyama, Y., Kawahara, N., & Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive veterinary medicine*, 149, 15–20.
37. Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, (2020). A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Revista Panamericana de Salud Pública*.

38. Mwachui, M. A., Crump, L., Hartskeerl, R., & Zinsstag, J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843>
39. Namita Joshi, N. J., Joshi, R. K., & Choudhary, G. K. (2008). Bovine leptospirosis: diagnosis and control.
40. Ojeda, J., Salgado, M., Encina, C., Santamaria, C., & Monti, G. (2018). Evidence of interspecies transmission of pathogenic *Leptospira* between livestock and a domestic cat dwelling in a dairy cattle farm. In Journal of Veterinary Medical Science (Vol. 80, Issue 8, pp. 1305–1308). Japanese Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0361>
41. OMSA (2022) Spanish - WHO PH Labs Webinar 220323 - Epidemiología y pruebas de diagnóstico de la leptospirosis. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=wQhCSwWA8lQ>
42. OMSA. (2021). Leptospirosis. <https://Leptospira.amc.nl/Leptospira-library>
43. Picardeau, M. (2013) Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Méd. Mal. Infect. 43, 1-9.
44. Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nature Reviews Microbiology, 15(5), 297-307.
45. Pinto, P. S., Libonati, H., & Lilenbaum, W. (2017). A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. In Tropical Animal Health and Production (Vol. 49, Issue 2, pp. 231–238). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1201-8>
46. Polle, F., Storey, E., Eades, S., Alt, D., Hornsby, R., Zuerner, R., & Carter, R. (2014). Role of Intraocular *Leptospira* Infections in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis in the Southern United States. Journal of Equine Veterinary Science, 34(11–12), 1300–1306. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.09.010>

47. Repiso MV, Gil A, Bañales PM, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, et al. 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). 2005; 40(157):5–28.
48. Repiso, M. V., Olivera, M. A., Herrera, B., Silva, M., Guarino, H., Nuñez, A., Osawa, T., Fernández, L., Bañales, P., & Gil, A. (2002). Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. INIA Serie Actividades de Difusión, (288).
49. Sanhueza, J. M., Heuer, C., & West, D. (2013). Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. Preventive Veterinary Medicine, 112(1-2), 90-98.
50. Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2023). A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. One health (Amsterdam, Netherlands), 17.
51. Sonada, R. B., Azevedo, S. S. D., Soto, F. R. M., Costa, D. F. D., Morais, Z. M. D., Souza, G. O. D., & Vasconcellos, S. A. (2018). Efficacy of leptospiral commercial vaccines on the protection against an autochthonous strain recovered in Brazil. Brazilian journal of microbiology, 49, 347-350.
52. Suanes, A., Macchi, M. V., Fernández, F., Salaberry, X., Moreira, C., & Gil, A. D. (2024). Seroprevalence and herd-level associated factors of pathogenic *Leptospira spp.* circulating locally in dairy cattle in Uruguay. Preventive Veterinary Medicine, 223, 106097.
53. Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., & Kudo, S. (2013). Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. Microbiology and Immunology, 57(3), 236–9.

54. Tonin, A. A., Martins, B., Zago, R. V. M. S., Tochetto, C., Azenha, N. P., Schaefer, P. C., Martins, J. L. R., & Badke, M. R. T. (2015). Outbreak of leptospirosis: reproductive losses in sheep. *Comparative Clinical Pathology*, 24(4), 961–965. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2056-x>
55. Verma A, Stevenson B, Adler B. (2013) Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1-2): 61-66.
56. Vieira, A. S., & Lilenbaum, W. (2017). Leptospirosis on captive wild animals in Latin America. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 115, pp. 496–500). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.001>
57. Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Ríos, C. Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(9).

## Caracterización del problema

En Uruguay la extracción de carne de rodeo vacuno es cada vez mayor año a año, con un desplazamiento hacia un rodeo cada vez más criador. Uruguay basa gran parte de su economía en la ganadería, en los últimos años la exportación de ganado en pie ha aumentado, al igual que la de carne vacuna; ambos rubros necesitan de un aumento sostenido de nacimiento de terneros por año. Resulta fundamental maximizar la eficiencia reproductiva en las vacas de cría, siendo un pilar imprescindible para aumentar la tasa de parición y así lograr un mayor número de terneros para producción de carne y reposición de vientres. La rentabilidad de la industria de ganado depende en gran medida del rendimiento y de la gestión reproductiva exitosa. En nuestro país, salvo algunas variaciones, las tasas de destete se han mantenido estancados en las últimas décadas. Si bien las causas son multifactoriales, las enfermedades reproductivas presentes en nuestro rodeo son un importante factor a tener en cuenta a la hora de diseñar medidas para aumentar los índices reproductivos.

Los estudios anteriores en Uruguay, tuvieron como resultado destacado aislar cepas autóctonas de *Leptospira spp.* en bovinos, esto no solo permitió conocer las cepas circulantes en el país y poner a punto el diagnóstico molecular, sino que también permitió optimizar el diagnóstico serológico de esta enfermedad al incluir dichas cepas en el panel de antígenos utilizado de rutina. Hubo 2 aislamientos que predominaron Hardjobovis y Pomona Kennewicki, si bien este resultado era esperable, existieron algunos matices como el hallazgo de la serovar Kennewicki pariente cercano de la serovar Pomona y el aislamiento de *Leptospira noguchii* con una diversidad dentro de los serogrupos tipificados. A partir de esta información, surgen nuevas preguntas vinculadas al impacto que tendrían estas cepas en los predios ganaderos del país y qué medidas de control son las más adecuadas para mitigar dicha enfermedad y tener como resultado el incremento de nacimientos de terneros, los cuales repercutirían positivamente sobre toda la cadena cárnica nacional.

El efecto de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, adaptada al bovino, es controvertido ya que algunos estudios no mostraron una asociación entre la seropositividad a este patógeno y el aborto (Carter *et al.* 1982, Dixon, 1983, Elder *et al.* 1985, Chappel *et al.* 1989) en contraste con muchos otros que si la asociaron como una causa de abortos (Ellis *et al.* 1985, Ellis *et al.* 1986). En Uruguay *L. Hardjo* serológicamente se distribuye ampliamente entre el ganado bovino de cría con una estimación de la seroprevalencia individual de aproximadamente el 23%. Sin embargo, ni su asociación con abortos ni las pérdidas atribuidas a *L. Hardjo* se han evaluado en rebaños de cría de carne. La *Leptospira interrogans* serovar Pomona y Kennewicki es una causa reconocida de tormentas de abortos en el ganado (Givens, 2006), sin embargo, su importancia tampoco ha sido estimada en nuestro país. Este proyecto pretende a través del seguimiento de predios ganaderos, estimar las pérdidas causadas por la leptospirosis bovina y asociarlas con las medidas de manejo para su control. Los resultados obtenidos procuran estimar su impacto en nuestro rodeo de carne.

Una comprensión más profunda de la epidemiología de la leptospirosis, incluidos los huéspedes de mantenimiento y el impacto en la producción ganadera, es esencial para comprender y diseñar estrategias de control eficaces para esta zoonosis. Para generar esta información, se tomarán muestra de suero de animales que conviven con los bovinos, tanto equinos, ovinos, suinos como caninos. La importancia de estos resultados radica no solo en el entendimiento de la transmisión de la enfermedad, sino que también en su impacto en la salud pública, ya que trabajadores rurales suelen estar en contacto estrecho con estas especies animales y suelen ser los más afectados según últimos informes del Ministerio de Salud Pública. Es sabido que las medidas de control en predios ganaderos deberían basarse en impedir las distintas vías de transmisión, para así evitar la difusión del agente. Es por eso que resulta clave seguir avanzando en el entendimiento del ciclo epidemiológico, y ver como las diferentes especies animales influyen en él. Una hipótesis clave de este trabajo es que la leptospirosis afecta la eficiencia reproductiva de las vacas de cría, generando un impacto negativo en las tasas

de parición, por lo que es esencial contar con medias de control que se adecuen a las condiciones actuales de los predios del país y sean económica y fácilmente aplicables.

## Objetivos

### OBJETIVO GENERAL

- Estudio de la leptospirosis bovina como causante de pérdidas reproductivas y puntos necesarios del ciclo epidemiológico a tener en cuenta para su control.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluación de las pérdidas reproductivas (aborto e infertilidad) en bovinos por infección con *Leptospira* bovina.
- Estudiar la dinámica de enfermedad e infección por *Leptospira spp.* en vacas preñadas a través de serología y detección de excreción (cultivo y PCR) por orina.
- Estudiar otras especies domésticas en contacto con bovinos como posibles transmisores de la enfermedad.

## **CAPÍTULO I: Leptospirosis as a cause of infertility in Uruguayan beef cattle**

Publicación en revista internacional Preventive Veterinary Medicine (Anexo I):

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.

## **CAPÍTULO II: Leptospirosis como causa de aborto en ganado para producción carne en Uruguay.**

### **RESUMEN**

La leptospirosis es una reconocida zoonosis bacteriana causada por *Leptospira spp.* En bovinos, su ocurrencia suele estar más vinculada a afecciones reproductivas, como es la ocurrencia de aborto. Este estudio pretende determinar la asociación del aborto con la seropositividad de cepas locales y los niveles de excreción por orina de *Leptospiras* patógenas en vacas para producción de carne no vacunadas en Uruguay. Se llevó a cabo un estudio de casos y controles en 31 predios ganaderos sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis de al menos un año. En cada predio, se les realizó seguimiento a 25 vacas preñadas de menos de tres meses de gestación. Se realizaron tres visitas a lo largo de la gestación de las vacas: dentro del primer tercio de gestación, dentro del segundo tercio de gestación y otra postparto. Se identificó en cada visita las vacas abortadas, colectando muestras de sangre y orina a estas vacas y a dos compañeras por cada abortada. A las muestras de sangre se les realizó diagnóstico serológico para *Leptospira spp.* (test de microaglutinación), rinotraqueitis infecciosa bovina (ELISA), diarrea viral bovina (ELISA) y *Neospora caninum* (ELISA). Con las muestras de orina se procedió a hacer qPCR para la detección de *Leptospiras* patógenas. Se realizó una regresión logística teniendo en cuenta al predio como variable aleatoria. El análisis incluyó 35 vacas abortadas y 61 vacas controles. Las vacas abortadas tenían 8.06 (95% IC: 1.55 - 41.86) veces más chance de ser seropositivas al serogrupo Pomona (punto de corte 1:100) con respecto a vacas preñadas o que habían paridos un ternero a término ( $p=0.01$ ). Por otro lado, se encontró una fuerte asociación con la seropositividad a *Neospora caninum*, vacas abortadas tenían 11.31 (95% IC: 3.0 - 42.6) veces más chance de ser seropositivas a este protozoario, con respecto al grupo control ( $p<0.01$ ). Si bien se establece asociación entre la

Leptospirosis y el aborto en vacas de carne, se deberían realizar estudios más dirigidos para establecer con mayor precisión el impacto de esta enfermedad en sistemas ganaderos.

*Palabras clave: aborto, ganadería, leptospirosis bovina.*

## SUMMARY

Leptospirosis is a recognized bacterial zoonosis caused by *Leptospira* spp. In cattle, its occurrence is often associated with reproductive disorders, such as abortion. This study aimed to determine the association between abortion and the seropositivity to local strains, as well as urinary shedding levels of pathogenic *Leptospira* in unvaccinated beef cattle in Uruguay. A case-control study was conducted in 31 beef farms without a vaccination history against leptospirosis for at least one year. On each farm, 25 pregnant cows with less than three months of gestation were monitored. Three visits were conducted during the cows' gestation: within the first trimester, within the second trimester, and postpartum. Aborted cows were identified during each visit, and blood and urine samples were collected from these cows and two control cows for each case. Blood samples were tested for *Leptospira* spp. (microscopic agglutination test), bovine infectious rhinotracheitis (ELISA), bovine viral diarrhea (ELISA), and *Neospora caninum* (ELISA). Urine samples were analyzed using qPCR for the detection of pathogenic *Leptospira*. A logistic regression model was performed, considering the farm as a random variable. The study included 35 aborted cows and 61 control cows. Aborted cows were 8.06 (95% CI: 1.55–41.86) times more likely to be seropositive for the Pomona serogroup (cutoff point 1:100) compared to pregnant cows or those that delivered a full-term calf ( $p=0.01$ ). Additionally, a strong association with seropositivity to *Neospora caninum* was found, with aborted cows being 11.31 (95% CI: 3.0–42.6) times more likely to be seropositive for this protozoan compared to the control group ( $p<0.01$ ). While an association between leptospirosis and abortion in beef cattle is established, further targeted studies are needed to more precisely determine the impact of this disease on cattle production systems.

*Keywords: abortion, livestock, bovine leptospirosis.*

## INTRODUCCIÓN

Uruguay, es reconocido por su industria ganadera, con más de 11 millones de bovinos en su territorio. En el año 2023, alcanzó a exportar en torno a 1 millón de toneladas de carne y 90 mil cabezas de ganado al pie (DIEA y MGAP, 2023). Estos niveles de producción, están directamente relacionados con los índices productivos y reproductivos en los predios ganaderos, por lo que es importante promover su mejora continua. Las enfermedades abortivas en bovinos son una de las causas más reconocidas por afectar estos indicadores, aunque es sabido que se encuentran subdiagnosticadas (Mee, 2023).

El aborto es una de las afecciones reproductivas más importantes en el ganado bovino y suele ser multifactorial, con diversas causas infecciosas que incluyen agentes bacterianos, virales, protozoarios y fúngicos (Reichel *et al.*, 2018; Givens, 2008). Entre las causas más destacadas a nivel mundial se encuentran *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, *Leptospira spp.*, el virus de la Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueitis infecciosa bovina (Herpesvirus bovino tipo 1). Estas enfermedades pueden provocar abortos en diferentes etapas de la gestación y están asociadas con una serie de complicaciones reproductivas (Givens, 2008).

La leptospirosis es reconocida por producir diferentes afecciones reproductivas en bovinos, siendo el aborto la más reportada a nivel mundial (Adler *et al.*, 2011). La ocurrencia de aborto puede darse principalmente de dos formas, según qué serovar sea el infectivo. La leptospirosis bovina incidental es ocasionada por serovares no adaptados al huésped, como por ejemplo Pomona, en este caso el aborto se desarrolla principalmente en el último tercio de gestación, y en rodeos puede ocurrir como tormenta de aborto. La leptospirosis bovina adaptada, se da cuando el bovino se infecta por serovares adaptados al huésped, como es el caso del serovar Hardjo bovis, donde la infección será del tipo crónica y asintomática, siendo más probable la ocurrencia de infertilidad y reabsorciones embrionarias. En este último caso los abortos son menos frecuentes, dándose a partir del cuarto mes de gestación (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

En Uruguay, se han identificado varias cepas circulantes en rodeos bovinos, incluyendo *L. interrogans* serogrupo Pomona, *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe, *L. noguchii* serogrupo Autumnalis, *L. noguchii* serogrupo Australis, *L. noguchii* serogrupo Pyrogenes, *L. interrogans* serogrupo Canicola, y dos cepas sin identificación de serogrupo de *L. noguchii* (Zarantonelli *et al.*, 2018). Si bien se sabe que estas cepas están circulando, y se ha estudiado su prevalencia en rodeos lecheros (Suanes *et al.*, 2023), se desconoce el impacto que tienen en la ocurrencia de aborto en ganado de carne. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue determinar la asociación del aborto con la seropositividad de cepas locales y los niveles de excreción por orina de *Leptospiras* patógenas en vacas de carne no vacunadas en Uruguay.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Diseño del estudio*

Se realizó un estudio del tipo casos y controles para evaluar la asociación entre Leptospirosis, Neosporosis e infecciones virales, y la ocurrencia de aborto en vacas de carne. Los predios fueron seleccionados en conjunto con 13 veterinarios de libre ejercicio. Se seleccionaron un total de 31 predios ganaderos utilizando un muestreo por conveniencia, debían de cumplir las siguientes condiciones: sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis en los últimos cinco años, el uso de ultrasonografía para el diagnóstico de gestación, y el mantenimiento de registros de información confiables. El período de servicio en estos predios se realizaba durante tres meses aproximadamente, desde diciembre hasta febrero, aplicando tanto el servicio con toro como inseminación artificial. Todo el ganado es obligatoriamente vacunado cada año contra la fiebre aftosa en febrero y mayo. Estos predios tampoco tenían historial de vacunación contra otras enfermedades reproductivas y estaban compuestos predominantemente por ganado Hereford o Angus. El muestreo se realizó durante los meses de marzo y abril de 2020 a 2022 en todo Uruguay.

En cada uno de los predios, los veterinarios de libre ejercicio realizaban la ecografía para el diagnóstico de gestación. Se seleccionaban aleatoriamente

25 vacas que estuvieran en el primer tercio de su gestación. Estas vacas eran identificadas individualmente, se le realizaban un total de tres muestreos: al momento de la ecografía (T1), durante el segundo tercio de gestación (T2) y luego de parida (T3). En el muestreo T2 se controlaba que la vaca hubiera mantenido la gestación mediante ecografía o tacto rectal, mientras que en el muestreo T3 se registraba aquellas vacas con ternero al pie. En todos los muestreos se tomaron muestras de sangre y orina a cada vaca. Se definió como caso a todas las vacas abortadas, es decir, vacas que estuvieran vacías en el T2 o no hubieran parido su ternero en el T3. En el caso del muestreo T1 si se observaba una vaca abortada en el momento de la visita esta era seleccionada también como caso. Por cada caso, se seleccionaron dos controles, dos vacas preñadas en ese mismo muestreo. Es importante destacar que las vacas controles no se repetían en los diferentes muestreos, y todas concluyeron su gestación de forma esperable.

Para este análisis se utilizaron un total de 96 vacas pertenecientes a 18 de los 31 predios seleccionados inicialmente. Como casos, se utilizaron un total de 35 vacas abortadas, mientras que 61 vacas se utilizaron como controles (preñadas). En la Tabla 1. se reportan la cantidad de vacas seleccionadas por muestreo.

| <b>Tabla 1.</b> Distribución de vacas abortadas (casos) y preñadas (controles) de acuerdo al momento de gestación en predio ganaderos |          |    |    |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----|----|-------|
|                                                                                                                                       | Muestreo |    |    | Total |
|                                                                                                                                       | T1       | T2 | T3 |       |
| Caso (vaca abortada)                                                                                                                  | 3        | 20 | 12 | 35    |
| Control (vaca preñada)                                                                                                                | 6        | 31 | 24 | 61    |
| T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto                                                          |          |    |    |       |

#### *Toma de muestras y análisis de laboratorio*

Se colectaron muestras de sangre mediante venopunción de la vena coccígea en tubos sin anticoagulante, y se transportaron refrigeradas. Los sueros fueron luego almacenados a -20 °C. Previo a la extracción de orina, cada vaca recibió administración intramuscular de diuréticos (~150 mg de furosemida, Furo R, Ripoll) y se le realizó una limpieza exhaustiva de los órganos genitales (limpieza con etanol al 70%). Se recolectaron aproximadamente 60 mL de orina de mitad del chorro en recipientes estériles de 120 mL y se transportaron a 4 °C al laboratorio junto con las muestras correspondientes de sangre/suero.

Las muestras de suero se emplearon para evaluar los títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* utilizando la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT, por sus siglas en inglés), siguiendo protocolos establecidos (Faine *et al.*, 1999). El punto de corte para determinar una muestra como positiva fue de 1:100. El panel de antígenos utilizado consistió en cepas locales de los serogrupos: Sejroe, Pomona, Autumnalis, Australis, Pyrogenes y Canicola; además de dos cepas locales no identificadas de la especie *noguchii* (Zarantonelli *et al.*, 2018). Para este último caso, una muestra era considerada como positiva para *L. noguchii* si mostraba reactividad con al menos una de las cepas.

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de lipL32 se realizó utilizando ADN purificado extraído de 10 mL de muestras de orina bovina, siguiendo los protocolos establecidos por Nieves (2018). La amplificación de PCR de LipL32 se logró utilizando los primers lipL32-188F (5'- TAAAGCCAGGACAAGCGCC-3') y lipL32-270R (5'- TACGAAGTCCCATTTCAGCG-3'). La qPCR se realizó en 10 µL de FastSart Universal SYBER Green Master, 0.20 µg/µL de albúmina sérica bovina (Sigma), 0.2 µL de primers para control endógeno (fragmento de gen gBlock - 1000 copias/µL), 5.8 µL de H<sub>2</sub>O libre de DNAsa/RNAsa, y 2 µL de ADN molde. El ciclado de PCR incluyó 1 ciclo de desnaturalización (10 min a 95 °C), 40 ciclos de amplificación (cada ciclo 30 s a 95 °C y 30 s a 60 °C), y un ciclo final para la curva de melting (15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C). El límite de detección de qPCR fue de 10 copias de *Leptospiras*. Una vez obtenidos los datos de cuantificación, se realizaron ajustes para normalizar el número de *Leptospiras* a 1 mL de orina. Estos ajustes tuvieron en cuenta el volumen

de elución (100 µL), el volumen de orina utilizado para la extracción (10 ml) y el volumen de ADN utilizado en la reacción de PCR (2 µL).

Se llevó a cabo la evaluación de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB), la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), y *Neospora caninum* para ser considerados en el proceso de modelado, dada su asociación reportada con el aborto en el ganado. Para la detección de anticuerpos contra DVB, se empleó un kit comercial de ELISA competitivo dirigido a los anticuerpos p80-125 (anti-NSP2-3) (ID Vet, Grabels, Francia). Se calculó la relación muestra/negativo (S/N %) como

$$SN\% = \frac{OD_{sample}}{OD_{NC}} 100$$

Donde  $OD_{sample}$  fue la densidad óptica de la muestra y  $OD_{NC}$  fue la densidad óptica del control negativo. Las muestras se consideraron positivas cuando  $S/N\% \leq 45\%$ . Con respecto a IBR, se utilizó un kit de ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia) para detectar anticuerpos anti-BHV-1. La relación muestra/positivo (S/P %) se calculó como

$$SP\% = \frac{OD_{sample} - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}} 100$$

Donde  $OD_{sample}$  fue la densidad óptica de la muestra,  $OD_{NC}$  fue la densidad óptica del control negativo, y  $OD_{PC}$  fue la densidad óptica del control positivo. Las muestras se consideraron positivas cuando  $S/P\% \geq 55\%$ .

Para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia). La fórmula para el cálculo de S/P% fue la misma que la establecida para el kit de IBR. Las muestras se consideraron positivas cuando  $S/P\% \geq 45\%$ . Los tres kits utilizados se ejecutaron estrictamente de acuerdo con los protocolos proporcionados por el fabricante. A todas las muestras se le realizó la técnica de Rosa de Bengala para el diagnóstico de Brucelosis Bovina.

En Uruguay se ha implementado un sistema legislado de trazabilidad individual que abarca a todo el ganado mediante caravanas electrónicas en las orejas. Este sistema garantiza la disponibilidad de información detallada para cada vaca. Por lo tanto, se documentó la edad de cada vaca.

#### *Análisis estadístico*

Se realizó un modelo de regresión logística de efectos mixtos para análisis multivariable utilizando STATA/IC 2015 (StataCorp, 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). La variable dependiente se categorizó como vacas preñadas o abortadas, mientras que la variable 'predio' se trató como una variable de estrato (efecto aleatorio). Todos los análisis se llevaron a cabo a nivel individual de la vaca. Para variables independientes continuas, se evaluó la linealidad con la variable de respuesta. En casos donde se identificó evidencia discernible de no linealidad, las variables independientes se categorizaron apropiadamente.

El análisis univariado se utilizó para evaluar la fuerza de la asociación entre la variable dependiente y las variables independientes. Las variables independientes consideradas para el análisis fueron: seropositividad a cada serogrupo de *Leptospira* (punto de corte 1/100), seropositividad a cada serogrupo de *Leptospira* (punto de corte 1/100) del muestreo anterior a la ocurrencia de aborto, qPCR, seropositividad a IBR, BVDV, y *Neospora caninum*; y la edad de las vacas. Las covariables que mostraron valores de  $p \leq 0,2$  en la prueba de chi-cuadrado se consideraron para su posible inclusión en el modelo multivariado. Se evaluó la colinealidad entre variables utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Si dos variables mostraban un coeficiente de correlación mayor de 0,7, se conservaba la variable más fuertemente relacionada con el resultado para un análisis posterior.

El modelo de regresión logística multivariado final se construyó manualmente utilizando el método forward. Las variables se añadieron al modelo en función de la significancia de los valores de  $p$  derivados de la prueba de Wald ajustada. La significancia del modelo completo se determinó utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés).

Además, se examinaron términos de interacción entre variables independientes con plausibilidad biológica. Para este propósito, se calcularon las odds ratio (OR) de Mantel-Haenszel para realizar la prueba de Homogeneidad. Las interacciones se evaluaron en casos donde el valor de  $p$  era menor que 0,05. Se investigaron posibles efectos de confusión, monitorizando alteraciones en las estimaciones de las variables retenidas en el modelo. Cambios en las estimaciones de parámetros superiores al 20% se consideraron indicativos de confusión y se mantuvieron en el modelo.

## RESULTADOS

Se colectaron muestras de un total de 96 vacas de carne, pertenecientes a 18 de los 31 predios seleccionados. Los 13 predios restantes se los excluyó ya que no se observó ocurrencia de aborto durante el período de estudio. Cada uno de los predios tuvieron una mínima de 1 y una máxima de 7 abortos en las vacas seleccionadas. Todas las muestras resultaron negativas a la prueba de Rosa Bengala.

En el análisis univariado 5 variables tuvieron una  $p < 0.2$  (Tabla 2.), por lo que fueron tenidas en cuenta para el análisis multivariado. La serología del muestreo anterior no tuvo asociación con la ocurrencia de aborto. Las dos variables continuas evaluadas (edad de las vacas y qPCR) no demostraron evidencia de linealidad con respecto a la variable de respuesta, por lo que fueron adecuadamente categorizadas (Tabla 2.). No se encontró indicios de correlación entre variables independientes.

**Tabla 2.** Análisis univariado de variables independientes asociadas con aborto en vacas de carne de Uruguay

| Variables                                                                           | Frecuencia % |         |       | valor-p | OR (95% IC)         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------|-------|---------|---------------------|
|                                                                                     | Caso         | Control | Total |         |                     |
| <b>Seropositividad según serogrupos de <i>Leptospira</i> (punto de corte 1:100)</b> |              |         |       |         |                     |
| Sejroe                                                                              | 28,6         | 26,2    | 27,1  | 0,8     | 1,13 (0,44 - 2,85)  |
| Pomona                                                                              | 14,3         | 4,9     | 8,3   | 0,14    | 3,22 (0,72 - 14,41) |

|                                                           |      |      |      |        |                    |
|-----------------------------------------------------------|------|------|------|--------|--------------------|
| Autumnalis                                                | 8,6  | 6,6  | 7,3  | 0,72   | 1,34 (0,28 - 6,35) |
| Australis                                                 | 8,6  | 4,9  | 6,25 | 0,48   | 1,81 (0,35 - 9,51) |
| Pyrogenes                                                 | 0    | 1,6  | 1,04 | 1      | -                  |
| Canicola                                                  | 2,9  | 0    | 1,04 | 0,37   | -                  |
| Noguchii species<br>(serogrupo ND)                        | 8,6  | 0    | 3,1  | 0,05   | -                  |
| <b>Copias de <i>Leptospiras</i>/mL de orina</b>           |      |      |      |        |                    |
| Sin detección de copias                                   | 71,4 | 63,9 | 66,7 | -      | <i>baseline</i>    |
| 10 - 50 copias                                            | 28,6 | 31,1 | 30,2 | 0,67   | 0,82 (0,32- 2,05)  |
| > 50 copias                                               | 0    | 4,9  | 3,1  | -      | 1                  |
| <b>Seropositividad a IBR</b>                              | 40   | 68,9 | 58,3 | < 0,01 | 0,30 (0,13 - 0,72) |
| <b>Seropositividad a DVB</b>                              | 74,3 | 80,3 | 78,1 | 0,49   | 0,71 (0,26 - 1,90) |
| <b>Seropositividad a <i>Neospora caninum</i></b>          | 37,1 | 6,6  | 17,7 | < 0,01 | 8,42 (2,5 - 28,6)  |
| <b>Edad de las vacas (mes)</b>                            |      |      |      |        |                    |
| < 36 meses                                                | 28,6 | 16,4 | 20,9 | -      | <i>baseline</i>    |
| 36 - 60 meses                                             | 54,3 | 55,8 | 55,2 | 0,27   | 0,55 (0,20 - 1,58) |
| > 60 meses                                                | 17,1 | 27,9 | 24   | 0,11   | 0,35 (0,42 - 2,40) |
| OR (95% IC): odds ratio con intervalo de confianza de 95% |      |      |      |        |                    |
| ND: No Determinado                                        |      |      |      |        |                    |
| Caso: vaca abortada; Control: vaca preñada                |      |      |      |        |                    |

En el análisis multivariado tres variables conformaron el modelo final (Tabla 3). Vacas abortadas tenían 8.06 veces más chance de ser seropositivas al serogrupo Pomona con respecto a vacas preñadas o que habían parido un ternero a término. Por otro lado, se encontró una fuerte asociación con la seropositividad a *Neospora caninum*, vacas abortadas tenían 11.31 veces más chance de ser seropositivas a este protozooario, con respecto al grupo control. Cuando se evaluaron posibles variables confusoras, se encontró que la adición de la variable seropositividad a IBR actuaba como potencial confusora con la seropositividad al serogrupo Pomona. El OR de serogrupo Pomona aumentaba un 52% cuando se incluía esta variable, pasando de 5.29 a 8.06 el OR, por lo que se decidió mantenerla en el modelo final.

| <b>Tabla 3.</b> Modelo de regresión logística de efectos mixtos, con variable <i>predio</i> como efecto aleatorio, para evaluar asociación de variables independientes con ocurrencia de abortos en vacas de carne en Uruguay |       |              |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------|---------|
| Variables                                                                                                                                                                                                                     | OR    | 95% IC       | valor-p |
| <b>Seropositividad a serogrupo Pomona (<math>\geq 1:100</math>)</b>                                                                                                                                                           | 8,06  | 1,55 - 41,86 | 0,01    |
| <b>Seropositividad a <i>Neospora caninum</i></b>                                                                                                                                                                              | 11,31 | 3,00 - 42,64 | < 0.01  |
| <b>Seropositividad a IBR</b>                                                                                                                                                                                                  | 0,23  | 0,09 - 0,66  | < 0.01  |
| <b>Intercept</b>                                                                                                                                                                                                              | 0,64  | 0,32 - 1,32  | 0,23    |
| 95% IC: 95% intervalo de confianza.                                                                                                                                                                                           |       |              |         |

## DISCUSIÓN

Si bien el aborto es reconocido en el sector agropecuario por su impacto a nivel reproductivo y productivo, este no siempre es fácil de detectar, sobre todo en ganadería donde los sistemas suelen ser extensivos. No solo se estima que hay un subregistro de su ocurrencia, sino que se torna difícil la identificación de la causa, ya que su etiología suele ser multifactorial. En bovinos, se considera aborto a cualquier muerte fetal o placentaria a partir del día 42 de gestación o bien expulsión del feto previo al límite de viabilidad (menor a 260 días), de todas maneras, estos límites pueden ser discutibles, ya que la viabilidad del ternero suele ser arbitraria (Mee, 2023).

La ocurrencia de aborto en bovinos a causa de infecciones por *Leptospira* varía de acuerdo a si el serovar infectante es del tipo incidental o adaptado. En los casos de las infecciones de serovares adaptados a los bovinos, como son el caso de Hardjo bovis, el aborto suele ocurrir de forma poco frecuente en los rebaños, pudiendo ocurrir de 6 a 12 semanas post infección. Por otro lado, si las infecciones son del tipo incidentales como ocurre con el serovar

Pomona, por ejemplo, el aborto ocurre más frecuentemente en los rebaños, y suele darse de 4 a 6 semanas post infección (Adler, 2010).

El serogrupo Sejroe fue el más prevalente en este trabajo seguido por el serogrupo Pomona. Esto coincide con lo reportado en el último estudio de seroprevalencia a nivel nacional (Suanes *et al.*, 2024) y con reportes de Latino América (Pinto *et al.*, 2017). Fávero *et al.* (2017) también encontraron estos serogrupos como más prevalentes en el sur de Brasil, y lograron asociarlos con afecciones reproductivas, determinando que vacas con problemas reproductivos tenían 8 veces más chances de ser seropositivas a *Leptospira*.

El serogrupo Pomona se lo vio asociado a la ocurrencia de abortos en vacas de carne. Esto coincide con lo reportado por Elder *et al.* (1985), que si bien asociaron la seropositividad de los serogrupos Sejroe y Pomona con el aborto, dicha asociación fue mayor en animales seropositivos a Pomona. Estos autores también reportaron que la asociación con el serogrupo Pomona aumentaba a medida que aumentaban los títulos de anticuerpos, encontrándose una mayor probabilidad de abortar en vacas con títulos >1:3000 (Elder *et al.*, 1985). En el presente trabajo, la asociación con títulos no fue posible, debiendo utilizarse únicamente el punto de corte de 1:100 ya que la cantidad de animales seropositivos fue muy baja. Una de las principales limitantes fue el bajo número de vacas que abortaron durante el periodo de estudio. Si bien se pudieron encontrar asociaciones, el 95% IC fue muy amplio, se debería utilizar un mayor número de muestras para poder establecer esta asociación de forma más precisa. En el trabajo de 1985, se procesaron un total de 5040 vacas de carne, de las cuales un 8% eran abortadas, esto le dio una gran potencia al trabajo (Elder *et al.*, 1985).

Si bien se ha reportado que el serogrupo Sejroe es causante de abortos en bovinos, estas cepas de *Leptospira* se encuentran adaptadas a los bovinos, causando abortos de forma esporádica (Grooms, 2006). Hardjo *bovis* es reconocida por circular en los rodeos de forma endémica en Uruguay (Suanes *et al.*, 2023), por lo que los abortos por este serovar son difíciles de observar. Esto se correlaciona también con el hecho de no haber encontrado asociación con niveles de excreción en orina, ya que la excreción está más asociada a

las infecciones con cepas adaptadas, en donde las vacas suelen cursar una infección del tipo crónica (Adler, 2015).

A nivel internacional *Neospora caninum* es una de las causas de aborto más frecuentes, en donde las campañas para su control siguen siendo un desafío (Mee, 2023). La neosporosis en el Uruguay se considera que se encuentra de forma endémica en el rodeo, tanto en ganadería (Bañales *et al.*, 2006) como en lechería (Macchi *et al.*, 2020), por lo que se esperaría que la ocurrencia de aborto se dé de forma esporádica mediante la transmisión del tipo endógena (Dubey *et al.*, 2006). En el año 2021, se llevó a cabo un estudio en 102 casos de aborto en vacas de leche en el país, observándose que la principal causa de aborto era *Neospora caninum* (29%), seguido de *Coxiella burnetti* (6%) y *Campilobacter fetus subsp. venerealis* (2%) (Macías-Rioseco *et al.*, 2020). Dadas estas condiciones, la asociación de aborto con neosporosis en este estudio era esperable, y necesaria de tener en cuenta cuando se evalúan cualquier potencial causa de aborto.

No se encontró asociación con el aborto y las cepas locales aisladas por Zarantonelli *et al.* (2018). Como se observa la seroprevalencia de estas cepas fue muy baja, tal como lo reporta Suanes *et al.* (2023) en el ganado lechero. No está claro el efecto que tienen estas cepas en bovinos, los bajo niveles de seropositividad podrían deberse a la baja circulación de estas cepas, o al bajo nivel de patogenicidad que tiene sobre los bovinos. Se deberían realizar estudios más dirigidos para evaluar el impacto que tienen en los índices reproductivos en bovinos.

## CONCLUSIÓN

La ocurrencia de aborto en ganadería es difícil de identificar, y aún más establecer la causa cuando el momento de aborto se desconoce. Si bien este trabajo logró reportar como factores de riesgo la seropositividad al serogrupo Pomona y a *Neospora caninum*, no se asoció la seropositividad de las cepas locales aisladas con el aborto en bovinos. Es difícil realizar estudios longitudinales para estudiar el aborto en bovinos, ya que su éxito depende de la cantidad de abortos que se tengan durante el período de estudio, lo cual es

difícil de estimar. Otro tipo de estudios deberían realizarse para medir el impacto que tiene la Leptospirosis en esta afección reproductiva.

## REFERENCIAS

1. Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. <http://www.springer.com/series/82>
2. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296.
3. Adler, B., Lo, M., Seemann, T., & Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 153, Issues 1–2, pp. 73–81). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.055>
4. 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), 15–20.
5. Daniel Givens, M., & Marley, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70(3), 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.018>
6. DIEA y MGAP (2023). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2023>
7. Dubey, J. P., Buxton, D., & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology*, 134(4), 267-289.
8. Elder, J. K., Pepper, P. M., Hill, M., & Ward, W. H. (1985). The significance of *Leptospiral* titres associated with bovine abortion. *Australian Veterinary Journal*, 62(8), 258–262.
9. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. *Leptospira* and leptospirosis. MediSci, Melbourne. Australia, p. 259.

10. Fávero, J. F., de Araújo, H. L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A. A., Baldissera, M. D., Stefani, L. M., & da Silva, A. S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial Pathogenesis*, 107, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>
11. Grooms, D. L. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, 66(3 SPEC. ISS.), 624–628. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.016>
12. Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
13. Macchi, M. V., Suanes, A., Salaberry, X., Fernandez, F., Piaggio, J., & Gil, A. D. (2020). Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 179, 105022.
14. 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 Veterinaria Brasileira*, 40(5), 325–332. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6550>
15. Mee, J. F. (2023). Invited review: Bovine abortion—Incidence, risk factors and causes. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 58, Issue S2, pp. 23–33). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/rda.14366>
16. Nieves Álvarez, C. J. (2018). Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación. DOI: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>

17. Pinto, P. S., Pestana, C., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2017). Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. *Acta Tropica*, 172, 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
18. Reichel, M. P., Wahl, L. C., & Hill, F. I. (2018). Review of diagnostic procedures and approaches to infectious causes of reproductive failures of cattle in Australia and New Zealand. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00222>
19. Suanes, A., Macchi, M. V., Fernández, F., Salaberry, X., Moreira, C., & Gil, A. D. (2024). Seroprevalence and herd-level associated factors of pathogenic *Leptospira spp.* circulating locally in dairy cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, 223, 106097.
20. Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, et al. (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 Negl Trop Dis* 12(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>.

### **CAPÍTULO III: Dinámica de enfermedad e infección por *Leptospira* spp. en vacas preñadas a través de serología y detección de excreción por orina.**

#### **RESUMEN**

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana causada por *Leptospira* spp.. Se ha reportado que es endémica en Latino América, siendo el diagnóstico en bovinos un desafío. Este trabajo pretende estudiar la dinámica de infección por *Leptospira* spp. en vacas preñadas a través de serología y detección de excreción (cultivo y qPCR) por orina. Se realizó un estudio longitudinal en 31 predios ganaderos sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis de al menos un año, para evaluar las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis. En cada predio, se les realizó seguimiento a 25 vacas preñadas de menos de tres meses de gestación. Se realizaron tres visitas a lo largo de la gestación de las vacas: dentro del primer tercio de gestación, dentro del segundo tercio de gestación y otra postparto. En cada visita se tomaron muestras de sangre y orina a las vacas preñadas. A las muestras de sangre se les realizó diagnóstico serológico para *Leptospira* spp. (test de microaglutinación, MAT), mientras que, con las muestras de orina se procedió a hacer qPCR para la detección de *Leptospiras* patógenas y aislamiento bacteriano. El 36,2 a 38,9% de las vacas fueron seropositivas a MAT con un punto de corte de 1/200 según el muestreo, siendo el serogrupo más prevalente Sejroe (39,2%) seguido por Pomona (6,9%). Los niveles de excreción (qPCR) estuvieron entre 28,1 a 31,5% entre los tres muestreos, sólo el 3,2% de las vacas fueron positivas en los tres muestreos. Se obtuvieron 51 aislamientos de *Leptospira* spp., pertenecientes a las especies *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, y *L. borgpetersenii*. Se utilizó el Kappa de Cohen para evaluar el nivel de acuerdo entre el MAT y qPCR, considerándose este un acuerdo sustancial (60,8%, punto de corte 1/200). Por otro lado, se observó que los animales seropositivos a Sejroe tenían 2,1 veces más chances de ser positivos a qPCR con respecto a los seropositivos a serogrupo Pomona ( $p<0,01$ ). A nivel predial, se encontró una correlación positiva entre la

proporción de animales seropositivos a MAT y la proporción de animales positivos a qPCR en cada predio. Teniendo en cuenta únicamente los animales con aislamientos, hubo una baja correlación entre serogrupo aislado y resultados del MAT, solo el 21,6% de los animales resultaron seropositivos a su propio serogrupo. A nivel predial no se encontró asociación entre serogrupo aislado y serogrupo más prevalente mediante el MAT. Este trabajo demostró que el MAT es una herramienta útil para predecir niveles de excreción en los rodeos sin antecedentes de vacunación contra Leptospirosis, pero dado el endemismo de la enfermedad y la gran variabilidad de las cepas circulantes, es difícil utilizar el MAT para predecir el serogrupo circulante en predios.

*Palabras clave: diagnóstico leptospirosis, vacas preñadas, herramientas diagnósticas.*

## SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial zoonotic disease caused by *Leptospira spp.* It has been reported as endemic in Latin America, with diagnosis in cattle being a challenge. This study aimed to investigate the infection dynamics of *Leptospira spp.* in pregnant cows through serology and urinary shedding detection (culture and qPCR). A longitudinal study was conducted on 31 beef farms without a vaccination history against leptospirosis for at least one year to evaluate different diagnostic techniques for leptospirosis. On each farm, 25 pregnant cows with less than three months of gestation were monitored. Three visits were conducted throughout gestation: within the first trimester, within the second trimester, and postpartum. During each visit, blood and urine samples were collected from the pregnant cows. Blood samples were tested for *Leptospira spp.* using the microscopic agglutination test (MAT), while urine samples were analyzed by qPCR for the detection of pathogenic *Leptospira* and bacterial isolation. Seropositivity to MAT (cutoff 1:200) ranged from 36.2% to 38.9% depending on the sampling time, with the most prevalent serogroup being Sejroe (39.2%), followed by Pomona (6.9%). Urinary shedding levels (qPCR) ranged from 28.1% to 31.5% across the three samplings, with only 3.2% of cows testing positive in all three samplings. A total of 51 *Leptospira spp.* isolates were obtained, belonging to the species *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, and *L. borgpetersenii*. Cohen's kappa coefficient was used to evaluate the agreement between MAT and qPCR, showing substantial agreement (60.8%, cutoff 1:200). Additionally, cows seropositive for the Sejroe serogroup were 2.1 times more likely to be qPCR-positive compared to those seropositive for the Pomona serogroup ( $p < 0.01$ ). At the farm level, a positive correlation was found between the proportion of MAT-seropositive animals and the proportion of qPCR-positive animals. When considering only animals with bacterial isolates, there was a low correlation between the isolated serogroup and MAT results, with only 21.6% of animals being seropositive to their own isolated serogroup. At the farm level, no association was found between the isolated serogroup and the most prevalent serogroup determined by MAT. This study demonstrated that MAT is a useful tool for predicting urinary shedding

levels in herds without a vaccination history against leptospirosis. However, due to the endemic nature of the disease and the high variability of circulating strains, MAT is not a reliable tool for predicting the circulating serogroup at the farm level.

*Keywords: leptospirosis diagnosis, pregnant cows, diagnostic tools.*

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira*. Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, que afecta a la mayoría de los mamíferos domésticos y animales salvajes (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Los miembros del género *Leptospira* son bacterias pertenecientes al filo *Spirochaetes*, orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae*. Se dividen en tres grupos: patógenas, intermedias y saprófitas, siendo las primeras causantes de la leptospirosis (Ko *et al.*, 2009). Por mucho tiempo, el género *Leptospira* era dividido en dos especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*. El primer grupo abarcaba todas las cepas patógenas, y el segundo agrupaba las saprófitas. Ambos grupos eran divididos en numerosos serovares en base a la técnica de aglutinación de absorción cruzada enfrentándose a diferentes antígenos homólogos (Adler, 2015; Levett, 2001); la cual pese a ser muy laboriosa, sigue siendo la técnica de referencia para la determinación de serovar. Con el desarrollo de tecnologías de biología molecular, como la hibridación de ADN, PCR y secuenciación de genomas completos, esta separación en dos especies se fue modificando. Durante la última década, el número de especies de *Leptospira* descritas se ha incrementado notablemente, pasando de 22 en 2014 a 69 en 2022, las cuales comprenden más de 300 serovariedades (Picardeau, 2017; Fernandes *et al.*, 2022). La clasificación a nivel de serovar está basada en la expresión de epítopes de superficie correspondientes al lipopolisacárido (LPS), en función de su composición y disposición espacial de azúcares (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). A su vez, aquellos serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos, por lo que serovares pertenecientes a diferentes especies pueden pertenecer al mismo serogrupo. Si bien la clasificación a nivel de serogrupo no tiene valor taxonómico, es útil para el diagnóstico y estudios epidemiológicos. Del género *Leptospira*, ocho especies (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. mayottensis*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi* y *L. weilli*) son las que constituyen un grupo particularmente patógeno (Vincent *et al.*, 2019).

La leptospirosis en animales se ha encontrado en casi todas las regiones, con la excepción de las regiones polares (Adler, 2015). Se han publicado un gran número de especies animales hospedadoras de *Leptospira spp.* para algunas de las 300 serovares de *Leptospiras* reconocidas (Cerqueira y Picardeau, 2009; Levett, 2015). Sin embargo, solo un pequeño número de serovares son endémicos en una región o país (Adler, 2015). En un ecosistema particular, el papel específico de cada huésped animal susceptible se divide en huésped de mantenimiento (adaptado) o incidental (no adaptado) (Hathaway, 1983; Levett, 2001; Ellis, 2015).

En la epidemiología de la leptospirosis el portador renal excreta las *Leptospiras* en el medio ambiente de forma intermitente (Adler, 2015). La infección renal y la excreción urinaria pueden durar años, y las *Leptospiras* pueden tener un tropismo importante para los tejidos distintos al riñón, por ejemplo, el tracto genital (Ellis *et al.*, 1986). En el caso de los bovinos, se demostró que pueden excretar *Leptospiras* por orina al menos por 18 meses después de la infección experimental (Thiermann 1982), y en caso de infecciones naturales hasta por 10 meses, pudiendo ser variable (Leonard *et al.*, 1992).

El diagnóstico de Leptospirosis en bovinos puede realizarse mediante dos formas básicas, a través de métodos directos e indirectos. El método a utilizar dependerá de los objetivos del diagnóstico, los recursos del laboratorio y la etapa de infección en la que se encuentre el animal (OMSA, 2021).

Dentro de los métodos directos para la detección de leptospirosis están incluidos: la visualización directa de organismos mediante microscopía de campo oscuro, el aislamiento bacteriano (cultivo) y métodos de detección de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Adler, 2015). El aislamiento bacteriano se puede realizar en sangre, orina y fluidos vaginales en animales vivos. La sensibilidad usualmente es baja, ya que dependerá mucho de la contaminación de la muestra y el estado de infección del animal en ese momento. El crecimiento bacteriano en medio de cultivo, es considerado como diagnóstico definitivo, pero tiene la desventaja de que puede demorar hasta

13 semanas en crecer dependiendo la carga bacteriana inicial que tenga la muestra, perdiendo la capacidad de diagnóstico temprano. Dada las dificultades que presenta el aislamiento bacteriano, hoy en día, el método directo de elección tanto por su alta sensibilidad como por su rapidez es la PCR. Esta técnica es muy efectiva para la detección de animales portadores o que están cursando la fase aguda de la enfermedad, las muestras utilizadas en animales vivos son las mismas que se utilizan para el aislamiento bacteriano (Schreier *et al.*, 2013). En el estudio realizado por Zarantonelli *et al.* (2018), se logró estimar que los niveles de excreción de *Leptospiras* en orina en los bovinos a nivel predial ronda el 20%, siendo fundamental la implementación de medidas de control para evitar la diseminación del agente, tanto por su potencial zoonótico como por su impacto a nivel productivo.

El método indirecto de referencia utilizado para el diagnóstico de *Leptospira* es la técnica de microaglutinación (MAT). Esta técnica se realiza en un microscopio óptico de campo oscuro y requiere la utilización de cepas vivas y puras como antígeno que deben ser conservadas en el laboratorio, debiendo abarcar la mayor cantidad de serogrupos posibles (OMSA, 2021). Los serogrupos que se utilizan en la técnica MAT varían según la especie o región, como regla general para que el MAT sea eficiente debe contener al menos un serovar de cada serogrupo circulante. Se ha observado un aumento en la sensibilidad de la técnica cuando se utilizan serogrupos propios de la región, por lo que los estudios varían de una región a otra por contener diferentes antígenos (Pinto *et al.*, 2017). Es por eso que la inclusión de serovares correctos en el panel de antígenos requiere de un amplio conocimiento epidemiológico de los serovares circulantes de la zona (Suanes *et al.*, 2023).

Si bien esta es la técnica de referencia para el diagnóstico serológico, se ha visto que muchas veces no se correlaciona con el diagnóstico mediante PCR, es decir, se ha observado que animales seronegativos son positivos a PCR en orina y viceversa (Otaka *et al.*, 2012). En un estudio llevado a cabo en Brasil, tampoco se correlacionaron los títulos serológicos en MAT con el resultado positivo de PCR, lo que remarca la intermitencia de esta bacteria (Hamond *et al.*, 2014). Este trabajo tiene por objetivo estudiar la dinámica

infección por *Leptospira spp.* en vacas preñadas a través de serología y detección de excreción (cultivo y PCR) por orina. De forma de evaluar cómo se comportan las diferentes técnicas en predios ganaderos en Uruguay.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Diseño del estudio*

Se realizó un estudio longitudinal en vacas preñadas para evaluar las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis. Se seleccionaron un total de 31 predios ganaderos utilizando un muestreo por conveniencia, debiendo de cumplir las siguientes condiciones: sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis en los últimos cinco años, el uso de ultrasonografía para el diagnóstico de gestación, y el mantenimiento de registros de información confiables. Para esto se contó con la colaboración de 13 veterinarios de libre ejercicio que estuvieran vinculados a dichos predio. El muestreo se realizó durante los meses de marzo y abril de 2020 a 2022 en todo Uruguay.

En cada uno de los predios, los veterinarios de libre ejercicio realizaban la ecografía para el diagnóstico de gestación. Se seleccionaban aleatoriamente 25 vacas que estuvieran en el primer tercio de su gestación. Estas vacas eran identificadas individualmente, se le realizaban un total de tres muestreos: al momento de la ecografía (T1), durante el segundo tercio de gestación (T2) y post parto (T3). En el muestreo T2 se controlaba que la vaca hubiera mantenido la gestación mediante ecografía o tacto rectal, mientras que en el muestreo T3 se registraba aquellas vacas con ternero al pie. En todos los muestreos se tomaron muestras de sangre y orina a cada vaca. Por otro lado, en el muestreo T1 también se seleccionaron de forma aleatoria 10 vacas falladas al momento de la ecografía, a estas vacas se les tomaba muestra de orina.

### *Toma de muestras y análisis de laboratorio*

Se colectaron muestras de sangre mediante venopunción de la vena coccígea en tubos sin anticoagulante, y se transportaron refrigeradas. Los sueros

fueron luego almacenados a -20 °C. Previo a la extracción de orina, cada vaca recibió administración intramuscular de diuréticos (~150 mg de furosemida, Furo R, Ripoll) y se le realizó una limpieza exhaustiva de los órganos genitales (limpieza con etanol al 70%). Se recolectaron aproximadamente 60 mL de orina de mitad del chorro en recipientes estériles de 120 mL y se transportaron a 4 °C al laboratorio junto con las muestras correspondientes de sangre/suero. Previo a la refrigeración de la muestra de orina, se procedió a inocular en el campo 100 µL de orina en 5 mL de medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (preparado con *Leptospira* Medium Base EMJH [Gibco] y albúmina BovoLep [Bovogen Biologicals PTY Ltd]), suplementado con 100 µg/mL de 5-fluorouracilo (5-FU). El medio de cultivo inoculado era transportado a temperatura ambiente al laboratorio.

Las muestras de suero se emplearon para evaluar los títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* utilizando la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT, por sus siglas en inglés), siguiendo protocolos establecidos (Faine *et al.*, 1999). Se evaluaron dos posibles puntos de corte: 1/100 y 1/200. El panel de antígenos utilizado consistió en cepas locales de los serogrupos: Sejroe, Pomona, Autumnalis, Australis, Pyrogenes y Canicola; además de dos cepas locales no identificadas de la especie *noguchii* (Zarantonelli *et al.*, 2018). Para este último caso, una muestra era considerada como positiva para *L. noguchii* si mostraba reactividad con al menos una de las cepas.

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de lipL32 se realizó utilizando ADN purificado extraído de 10 mL de muestras de orina bovina de las vacas preñadas, siguiendo los protocolos establecidos por Nieves (2018). La amplificación de PCR de LipL32 se logró utilizando los primers lipL32-188F (5'- TAAAGCCAGGACAAGCGCC-3') y lipL32-270R (5'- TACGAACTCCCATTTCAGCG-3'). La qPCR se realizó en 10 µL de FastSart Universal SYBER Green Master, 0.20 µg/µL de albúmina sérica bovina (Sigma), 0.2 µL de primers para control endógeno (fragmento de gen gBlock - 1000 copias/µL), 5.8 µL de H<sub>2</sub>O libre de DNAsa/RNAsa, y 2 µL de ADN molde. El ciclado de PCR incluyó 1 ciclo de desnaturalización (10 min a 95 °C), 40 ciclos de amplificación (cada ciclo 30 s a 95 °C y 30 s a 60 °C), y un ciclo

final para la curva de melting (15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C). El límite de detección de qPCR fue de 10 copias de *Leptospiras*. Una vez obtenidos los datos de cuantificación, se realizaron ajustes para normalizar el número de *Leptospiras* a 1 mL de orina. Estos ajustes tuvieron en cuenta el volumen de elución (100 µl), el volumen de orina utilizado para la extracción (10 ml) y el volumen de ADN utilizado en la reacción de PCR (2 µl).

A los medios de cultivo EMJH inoculados en campo, tanto de las vacas preñadas como falladas, se les realizaba en el laboratorio dos diluciones seriadas, se tomaba 100 µL del tubo inicial (A) y se inoculaba el tubo B (5 mL de EMJH) y se repetía el proceso del tubo B al C, de forma que por cada muestra de orina se obtenían tres cultivos. Estos eran incubados en estufa a 28±1 °C hasta por seis meses. Los cultivos eran visualizados en microscopio de campo oscuro cada 10 a 15 días durante ese periodo. En caso de contaminación por otros microorganismos, los cultivos se filtraban a través de un filtro estéril de jeringa de 0,22 µm (Millipore Corporation, MA, EE. UU.) y se sembraban en medios EMJH frescos. Tan pronto como crecían bacterias similares a espiroquetas en cultivos específicos, la presencia de especies patógenas de *Leptospira* se evaluaba mediante amplificación por qPCR del gen lipL32 (descrito anteriormente). Una vez que el cultivo estaba libre de contaminación, los cultivos confirmados por PCR se sembraban en medios EMJH sin 5-FU hasta la fase de crecimiento exponencial. Luego, los aislamientos de *Leptospira spp.* se conservaban a 10<sup>8</sup> células/mL en EMJH con 2.5% de dimetilsulfóxido (Sigma) en nitrógeno líquido.

Para la tipificación de las cepas de *Leptospira* se remitieron las cepas al Instituto Pasteur de Montevideo, donde se procedió a la tipificación molecular de los aislamientos en estudio mediante amplificación y posterior secuenciación de los genes 16S rDNA y secY. Por otro lado, en DILAVE Montevideo se realizó la determinación de serogrupo de los aislamientos. Se utilizó el MAT con un panel de antisueros de conejo específicos de serogrupos, que abarcaba 23 serogrupos de *Leptospira* (KIT Royal Tropical Institute, Tabla 1), realizada en placas de microtitulación, mezclando volúmenes iguales de *Leptospiras* viables con diluciones seriadas al doble de

cada antisuero de conejo. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se observó la aglutinación de las bacterias mediante microscopía de campo oscuro. El serogrupo de la cepa se asignó de acuerdo con el antisuero que dio el título de aglutinación más alto, las diluciones realizadas fueron de 1/800 a 1/12800.

**Tabla 1.** Panel de antisueros de conejos utilizados para determinación de serogrupo en aislamientos de *Leptospira spp.*

| Serogrupo           | Serovar              | Cepa            |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| Australis           | Bratislava           | Jez Bratislava  |
| Autumnalis          | Bangkinang           | Bangkinang I    |
| Ballum              | Ballum               | Mus 127         |
| Bataviae            | Bataviae             | Swart           |
| Canicola            | Canicola             | Hond Utrecht IV |
| Celledoni           | Celledoni            | Celledoni       |
| Cynopteri           | Cynopteri            | 3522 C          |
| Grippotyphosa       | Grippotyphosa        | Moskva V        |
| Hebdomadis          | Hebdomadis           | Hebdomadis      |
| Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae  | RGA             |
| Javanica            | Poi                  | Poi             |
| Louisiana           | Louisiana            | LSU 1945        |
| Manhao              | Manhao               | L 60            |
| Mini                | Mini                 | Sari            |
| Panama              | Panama               | CZ 214 K        |
| Pomona              | Pomona               | Pomona          |
| Pyrogenes           | Pyrogenes            | Salinem         |
| Sarmin              | Weaveri              | CZ 390          |
| Sejroe              | Hardjo type Prajitno | Hardjoprajitno  |
| Shermani            | Shermani             | 1342 K          |
| Tarassovi           | Tarassovi            | Perepelitsin    |
| Semaranga           | Patoc                | Patoc I         |
| Leptonema           | Illini               | 3055            |

Por último, se documentó la edad de cada vaca. En Uruguay se ha implementado un sistema legislado de trazabilidad individual que abarca a todo el ganado mediante caravanas electrónicas en las orejas. Este sistema garantiza la disponibilidad de información detallada para cada vaca.

#### *Análisis de datos*

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa STATA/IC 2015 (StataCorp, 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX:

StataCorp LLC). Para la representación gráfica de los resultados se utilizó Python (Python Software Foundation. 2023. Versión 3.11)

Se realizó un análisis descriptivo inicial en donde se calculó el porcentaje de animales positivos para aislamiento, qPCR y MAT a nivel individual, predial y por muestreo. Para el caso del MAT se evaluó la seropositividad en general (se consideraba positivo un animal cuando era positivo al menos para un serogrupo) y de forma independiente para cada serogrupo.

- Interacción del MAT con el qPCR

Se realizó un análisis entre los resultados de serología y los de qPCR, para poder establecer la correlación que tiene el MAT con los niveles de excreción. El análisis se realizó primero a nivel individual y luego a nivel predial.

Para el análisis a nivel individual se realizó una regresión logística de efectos mixtos. Se utilizaron las variables predio y vaca como efecto aleatorio, ya que había más de una observación (máximo tres) por individuo. La variable dependiente fue el resultado de qPCR, mientras que el resultado de serología se utilizó como variable independiente. De forma similar, se compararon los títulos de los serogrupos Sejroe y Pomona con los niveles de excreción, en este caso la variable dependiente fue el qPCR, mientras que se utilizó los títulos de Sejroe o Pomona como variables dummy independientes. Los diferentes modelos eran evaluados por medio de la prueba de Wald ajustada. Por otro lado, se realizó el test de Kappa de Cohen para evaluar la concordancia entre ambas técnicas.

También se evaluó la asociación entre la edad de los animales y los resultados de laboratorio, realizando una regresión logística de efectos mixtos, en este caso la edad de los animales se categorizó en tres: < 36 meses, 36-60 meses, >60 meses. Se la tomó como variable independiente.

Para el análisis a nivel predial se calculó la proporción de animales seropositivos por MAT y positivos a qPCR en cada uno de los predios en cada muestreo. Se determinó si esas variables estaban asociadas por medio de una regresión lineal de efectos mixtos, incluyendo a los predios como efecto aleatorio, ya que en este caso también se contaba con un máximo de tres

observaciones por predio. Se considera a la proporción de animales positivos a qPCR como variable de respuesta, mientras que la proporción de positivos a MAT fue la variable independiente, de forma de evaluar que tan bien predice la seroprevalencia la proporción de animales excretores.

- Evaluación del MAT y qPCR en vacas con aislamientos de *Leptospiras* patógenas

Se evaluaron las técnicas de MAT y qPCR en las vacas con las que se contaba con aislamiento, para determinar si estas técnicas pueden ser utilizadas como indicadores del serogrupo circulante. Nuevamente se decidió hacer dos tipos de estudio, uno a nivel individual y otro a nivel predial.

Para el análisis a nivel individual se tomaron las vacas con aislamiento y se evaluaron sus resultados serológicos y de qPCR en orina. Para el caso del MAT se utilizaron solo los aislamientos que se había logrado identificar el serogrupo, y dicho serogrupo estaba incluido en el panel de antígenos utilizados en el estudio.

En el análisis a nivel predial, se trabajó con los predios con aislamiento, utilizando el aislamiento para caracterizar a los predios de acuerdo a las cepas circulantes. Se calculó la prevalencia intrapredial en cada muestreo de cada predio tanto para el MAT como para el qPCR. Se determina si las variables están correlacionadas por medio de un z-test.

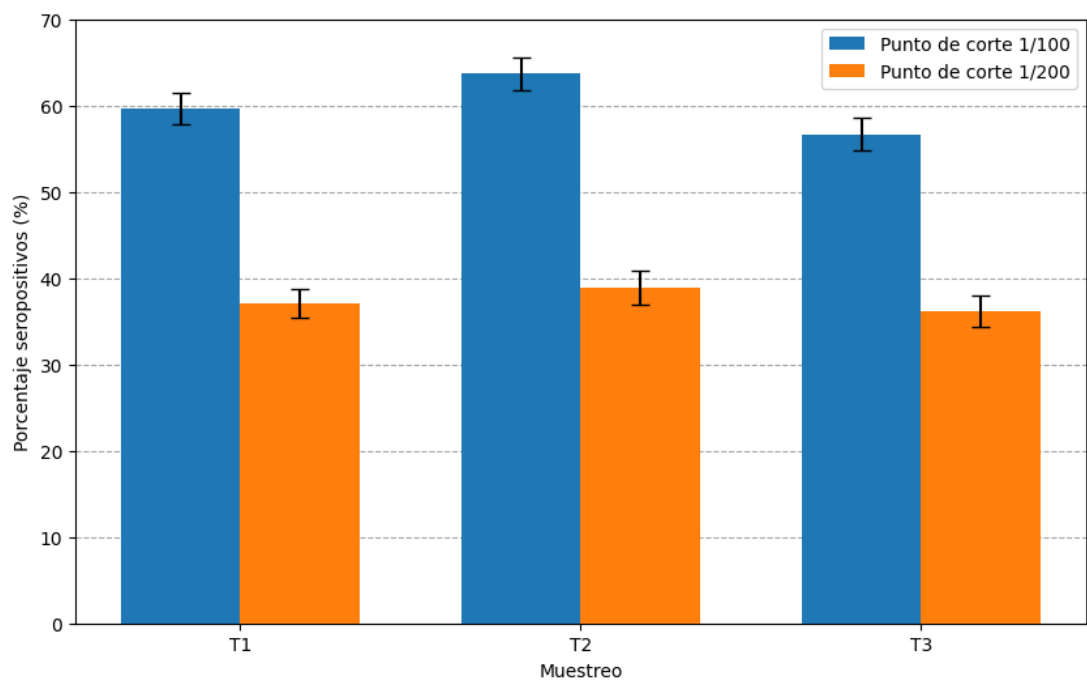
## RESULTADOS

### *Descripción de datos*

Se seleccionaron un total de 31 predios ganaderos distribuidos en 10 departamentos del territorio uruguayo. En 25 de los predios se realizaron los tres muestreos pre-definidos, en cinco de los predios se realizaron dos muestreos (T1 y T3), mientras que en uno de los predios se pudo realizar únicamente un muestreo (T1). En total se tomaron 2092 muestras, que consistieron en 718 vacas preñadas en el T1, 619 en el T2, y 697 vacas en el T3. Para el caso del aislamiento también se incluyeron 303 muestras de orina de las vacas falladas.

- Resultados serología

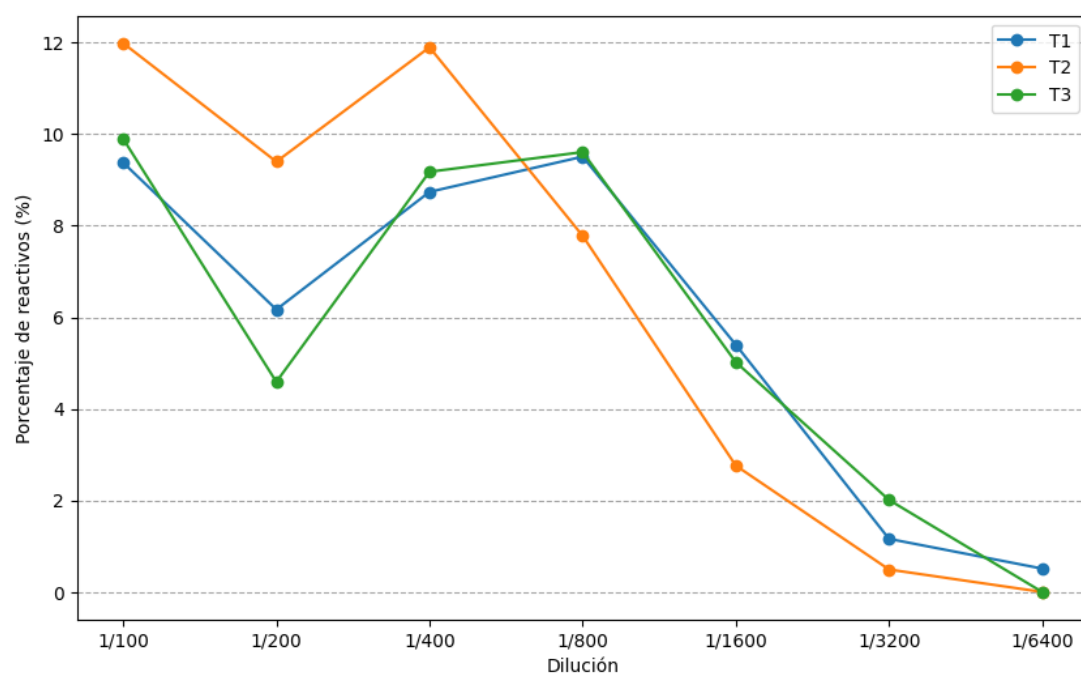
Se evaluaron la proporción de vacas seropositivas al MAT utilizando dos puntos de corte 1/100 y 1/200, se consideraba seropositivo un animal cuando era reactivo al menos a un serogrupo para cada uno de los puntos de corte. En la Figura 1 se observa la proporción de animales seropositivos por muestreo, no se observaron diferencias significativas entre muestreos. Cuando se evaluó la edad de los animales y los resultados serológicos, se observó que las vacas mayores a 60 meses tenían 2.96 (95% IC 1,1-8,0;  $p=0,03$ ) veces más chance con respecto a vacas menores de 36 meses de ser seropositivas al menos a un serogrupo en el MAT con un punto de corte de 1/100.



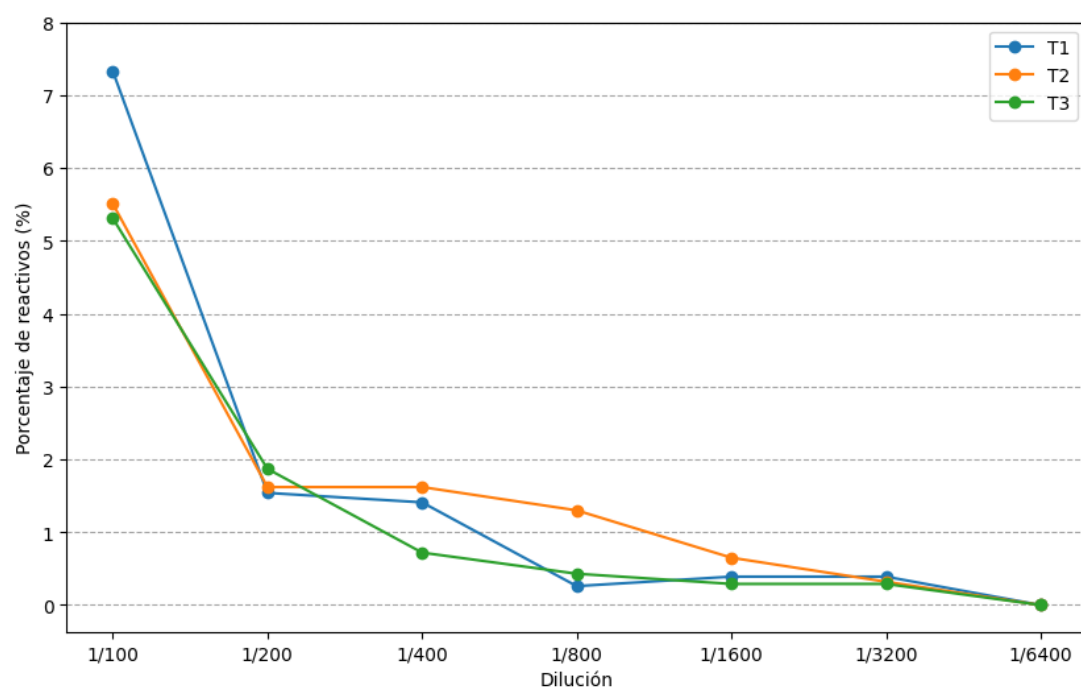
**Figura 1.** Proporción de vacas preñadas seropositivas a *Leptospira spp.* mediante MAT con puntos de corte 1/100 y 1/200 en cada muestreo. T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto

Los Serogrupos más seroprevalentes fueron Sejroe (39,2%, punto de corte 1/200), seguido por Pomona (6,9%, punto de corte 1/200). En la Figura 2 se observan los títulos obtenidos por muestreo para el serogrupo Sejroe, el 59,1% de las vacas fueron No Reactivas (NR) en el T1 para este serogrupo, en el T2 el 55,6%, mientras que en el T3 el 59,7% fueron NR. Por otro lado,

en la Figura 3 se observa para el caso del serogrupo Pomona, reportándose que el 88,7%, 90,6% y 91,1% de las vacas fueron NR en el T1, T2 y T3 respectivamente.

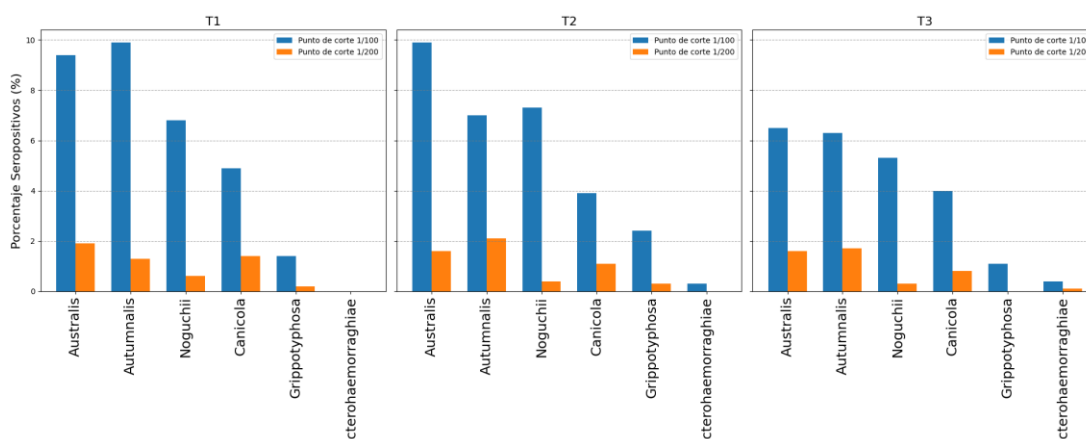


**Figura 2.** Porcentaje de vacas preñadas reactivas según dilución por MAT a serogrupo Sejroe en cada muestreo. T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto



**Figura 3.** Porcentaje de vacas preñadas reactivas según dilución por MAT a serogrupo Pomona en cada muestreo. T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto

Por otro lado, se reportó una baja prevalencia de los otros serogrupos utilizados en la técnica (Figura 4), en este caso se incluyó también a la especie *noguchii* que se consideraba positiva cuando al menos una de las cepas era reactiva.



**Figura 4.** Proporción de vacas preñadas seropositivas a diferentes serogrupos mediante MAT con puntos de corte 1/100 y 1/200 en cada muestreo. T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto

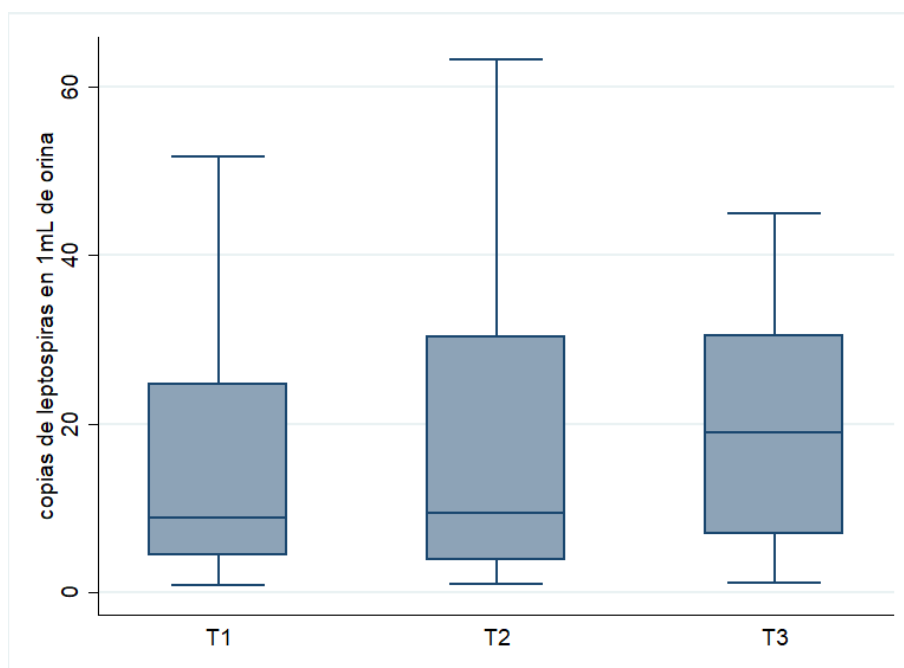
Al realizar el seguimiento de las vacas preñadas se observó que, utilizando un punto de corte de 1/200, el 49,5% de las vacas resultaron seronegativas a los tres muestreos, el 18,0% fueron seropositivas únicamente a un muestro, el 15,2% a dos muestreos y el 17,4% fueron seropositivas a los tres muestreos. Si se tiene en cuenta solo al serogrupo Sejroe el 12,7%, 13,5%, y 14,9% fueron seropositivas a uno, dos y tres muestreos respectivamente.

Al evaluarse la seroconversión en los animales en estudio, se reportó que el 9,4% de los animales se seropositivizaron durante el periodo de estudio. El 8,8% se seronegativizaron, dándose esto únicamente en el T3.

- Resultados qPCR

Cuando se les realizó el qPCR a las muestras de orina de las vacas, se observó que el  $28,1 \pm 1,6\%$  de las vacas preñadas eran positivas a qPCR en el T1,  $19,1 \pm 1,6\%$  en el T2, y  $31,5 \pm 1,8\%$  en el T3. Las diferencias significativas fueron dadas únicamente en el muestreo T2 con respecto a los dos muestreos restantes ( $p < 0,01$ ). No hubo diferencias entre los niveles de secreción y la edad de los animales.

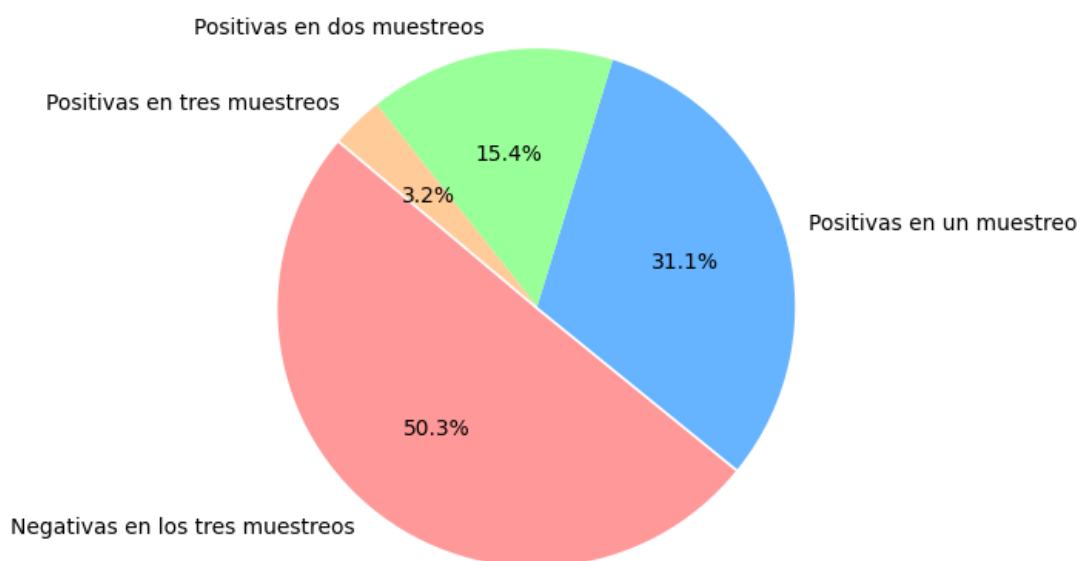
Si se tiene en cuenta únicamente las vacas positivas a qPCR en cada uno de los muestreos, la media de excreción de copias de *Leptospira* cada 1 mL de orina fue de  $228,7 \pm 112,0$ ;  $55,8 \pm 17,8$ ; y  $1046,0 \pm 679,7$  en los muestreos T1, T2, y T3 respectivamente. La distribución de estos datos se puede observar con mayor precisión en la Figura 5, observándose que no hubo grandes fluctuaciones entre muestreos.



**Figura 5.** Excreción de copias de *Leptospiras* en 1 mL de orina de acuerdo a los muestreos T1, T2 y T3 en vacas preñadas que resultaron positivas al qPCR. T1=primer tercio de gestación; T2=segundo tercio de gestación; T3=post-parto

Se evaluaron los resultados de qPCR en los tres muestreos en las vacas preñadas, reportándose que solo 25 vacas (3,21%) fueron qPCR positivas en

los tres muestreos, lo que reafirma la intermitencia de la excreción de *Leptospiras* en orina (Figura 6).



**Figura 6.** Proporción de vacas preñadas que fueron positivas a qPCR para *Leptospiras* patógenas en uno, dos o tres de los muestreos realizados.

- Resultados aislamientos

Durante el período de 2020 a 2022 se aislaron un total de 51 cepas de *Leptospiras* patógenas, 22 en el año 2020, 19 en el 2021 y cuatro cepas en el 2022 (en este último año se muestrearon 4 predios). Se logró el aislamiento en 21 de los 31 predios muestreados, y en cada uno de estos predios se obtuvieron un mínimo de uno y máximo de ocho aislamientos. En siete de los predios se encontraron dos cepas diferentes, y en tres de los predios tres cepas diferentes, sin encontrarse una correlación entre las cepas encontradas en los diferentes predios. En nueve vacas se obtuvieron aislamiento en dos de los muestreos, aislándose siempre la misma cepa en estos casos. Seis de los aislamientos correspondieron a las vacas falladas. En la Tabla 2 se observan las especies y serogrupos encontrados.

---

**Tabla 2.** Identificación de 51 aislamientos de *Leptospira spp.* encontrados en el periodo 2020-2022 en vacas pertenecientes a 31 predios ganaderos en Uruguay

---

| <b>Especie</b>           | <b>Serogrupo</b> | <b>n</b> |
|--------------------------|------------------|----------|
| <i>L. Borgpetersenii</i> | Sejroe           | 2        |
| <i>L. Interrogans</i>    | Canicola         | 3        |
|                          | Pomona           | 3        |
|                          | Australis        | 8        |
| <i>L. Noguchii</i>       | Autumnalis       | 7        |
|                          | ND               | 4        |
|                          | Panama           | 1        |
|                          | Pyrogenes        | 1        |
|                          | ND               | 2        |
| <i>L. Santarosai</i>     | Sarmin           | 2        |
|                          | Sejroe           | 3        |
|                          | Shermani         | 2        |
|                          | Australis        | 2        |
| ND                       | Autumnalis       | 2        |
|                          | ND               | 2        |
|                          | Pyrogenes        | 1        |
|                          | Sarmin           | 1        |
|                          | Sejroe           | 5        |

ND=No Determinado

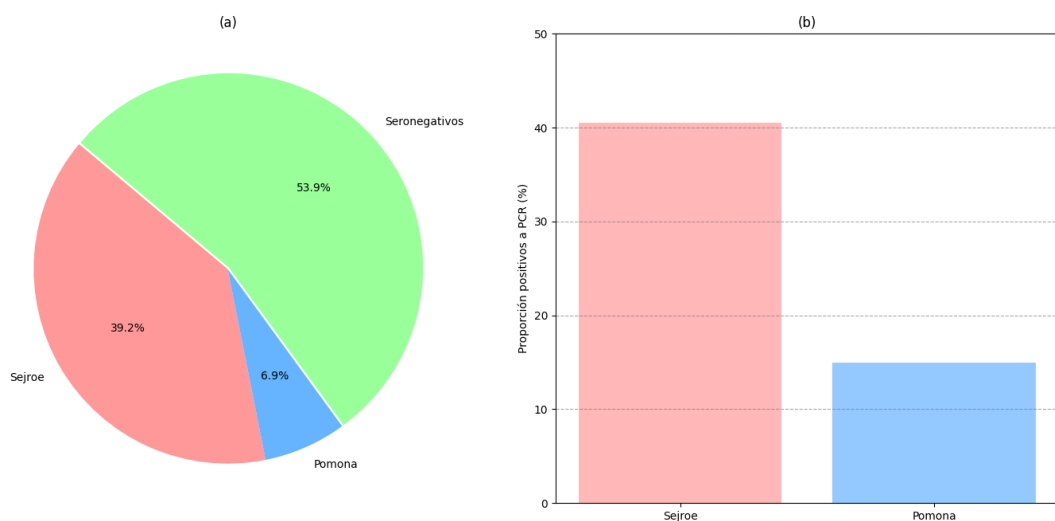
#### *Interacción del MAT con el qPCR*

- A nivel individual

Se evaluó la correlación entre el MAT y el qPCR por medio del test Kappa, para eso se evaluaron dos puntos de corte en el MAT: 1/100 y 1/200. Considerándose positiva una muestra cuando era seropositiva al menos a un

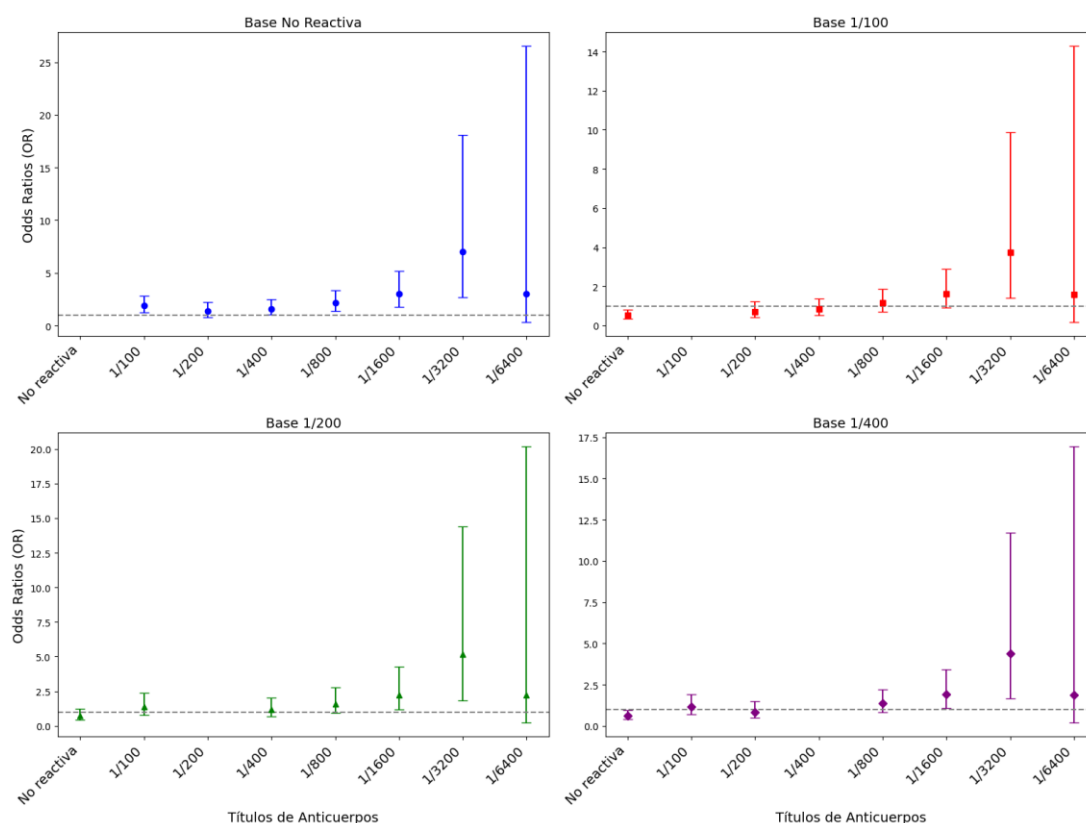
serogrupo en esos puntos de corte. El nivel de acuerdo para el caso del punto de corte 1/100 fue del 50,5% (acuerdo moderado), mientras que para el caso de 1/200 fue de 60,8% (acuerdo substancial).

Se encontró asociación entre animales seropositivos a MAT y positivos a qPCR, animales seropositivos con un punto de corte de 1/100 tenían 1,76 (95% IC 1,33-2,32;  $p < 0,01$ ) veces más chance de ser qPCR positivos con respecto a vacas seronegativas, Para el caso del punto de corte de 1/200 el OR fue de 1,66 (95% IC 1.27-2.16;  $p < 0,01$ ). Cuando se consideró únicamente los animales que eran seropositivos a Sejroe o Pomona (punto de corte 1/200; Figura 7(a)) se observó que los animales seropositivos a Sejroe tenían 2,1 veces más chances de ser positivos a qPCR con respecto a los seropositivos del serogrupo Pomona ( $p < 0,01$ ). En la Figura 7(b) se representa los niveles de excreción en el muestreo T1 de ambos grupos de animales (seropositivos a Sejroe vs. seropositivos a Pomona).



**Figura 7.** Comparación de niveles de excreción en vacas preñadas seropositivas por MAT a serogrupos Sejroe o Pomona. En Figura 7(a) se reporta proporción de animales seropositivos mediante MAT a los serogrupos Sejroe y Pomona, en la Figura 7(b) se evalúan niveles de excreción según resultados de serología.

Para el caso del serogrupos Pomona, no hubo diferencias entre los títulos obtenidos por MAT y los niveles de excreción. Para el caso del serogrupo Sejroe sí se encontraron diferencias (Figura 8), viéndose que los animales con títulos de 1/1600 y 1/3200 tenían mayor riesgo de excreción en comparación a vacas con títulos  $\leq 1/400$ .



**Figura 8.** Representación gráfica de modelo mixto de regresión logística de resultado de qPCR como variable dependiente y título en MAT para serogrupo Sejroe como variable independiente (dummy), cambiando la categoría base tomada como referencia. Variables aleatorias incluidas en el modelo: predio, vaca.

- A nivel predial

Se buscó la asociación entre la proporción de animales positivos a ambas técnicas, evaluando dicha proporción en cada uno de los predios en cada muestreo. En la regresión lineal mixta (predio como variable aleatoria) se observó una asociación positiva, es decir, a medida que aumentaba la

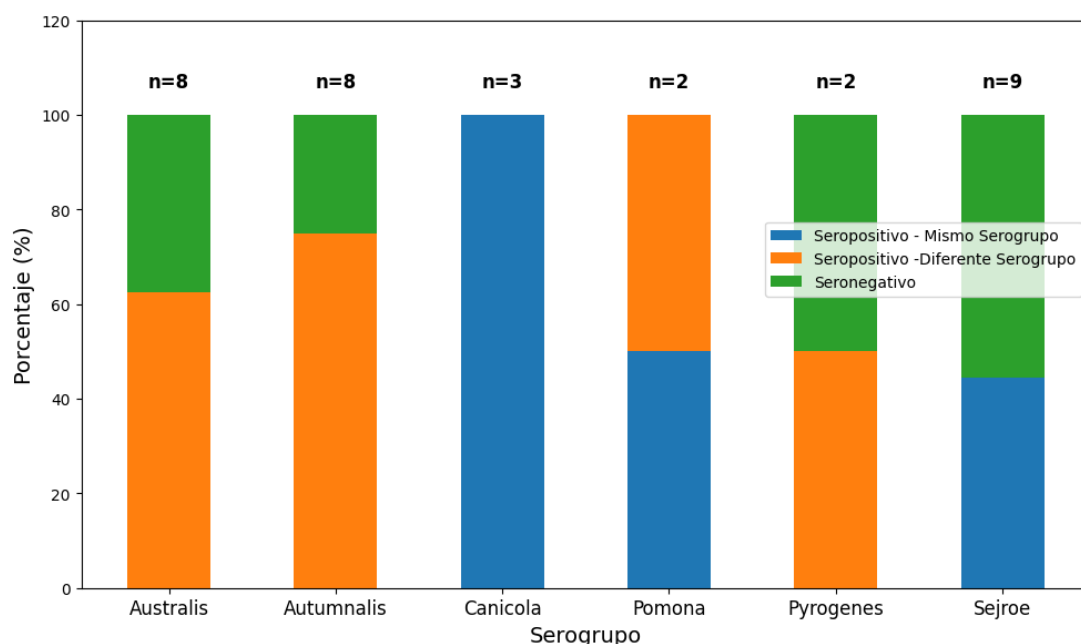
proporción de animales seropositivos a MAT (punto de corte 1/100) también lo hacía la proporción de animales positivos a PCR (Tabla 3). Por cada 10% que incrementa la seroprevalencia en los predios aumenta 2,9% la proporción de animales excretores.

| <b>Tabla 3.</b> Modelo de regresión lineal de efectos mixtos, con variable predio como efecto aleatorio, para evaluar asociación entre proporción de animales seropositivos a MAT (punto de corte 1/100; variable independiente) y positivos a qPCR en orina en predios ganaderos en Uruguay |             |              |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|---------|
| Variables                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Coeficiente | 95% IC       | valor-p |
| <b>Proporción de animales seropositivos a MAT</b>                                                                                                                                                                                                                                            | 0,29        | 0,04 - 0,54  | 0,02    |
| <b>Intercept</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             | 0,10        | -0,07 - 0,27 | 0,24    |
| 95% IC: 95% intervalo de confianza.                                                                                                                                                                                                                                                          |             |              |         |

#### *Evaluación del MAT y qPCR en vacas con aislamientos de *Leptospiras* patógenas:*

- A nivel individual

Tomando únicamente las vacas con aislamiento, se encontró que el 32,4% eran seronegativas a MAT, el 21,6% eran seropositivas a su serogrupo (utilizando el título más alto como indicador de serogrupo infectivo), y el 46% eran seropositivas a un serogrupo diferente del aislado. En la Figura 9 se puede observar esta distribución de acuerdo a los serogrupos, las mayores concordancias se dieron con el serogrupo Canicola y Sejroe. En cuanto a los títulos obtenidos en los casos en que el serogrupo del aislamiento y el serogrupo seropositivo a MAT coincidía, eran variables, yendo de 1/100 a 1/6400.



**Figura 9.** Asociación entre aislamientos de *Leptospiras* en orina según serogrupo y resultado serológico en MAT en vacas preñadas de predios ganaderos.

Para el qPCR se reportó que el 60% de las orinas con aislamiento eran positivas a qPCR. De esas muestras en las que coincidía el aislamiento con el qPCR, el 81.5% tenían menos de 100 copias de *Leptospira* por mL de orina, mientras que el 18.5% restante tenían más de 100 copias.

Solo dos de las vacas con aislamiento abortaron, en una de ellas el aislamiento obtenido fue del serogrupo Pomona, fue seropositiva a MAT serogrupo Pomona con un título de 1/1600 y positiva a qPCR (52 copias de *Leptospiras* en 1 mL de orina). En la segunda vaca se obtuvo aislamiento del serogrupo Pyrogenes, en este caso la serología resultó positiva con un título de 1/200 al serogrupo australis y negativa a qPCR en orina.

- A nivel predial

Se trabajó con los predios con aislamiento, utilizando el aislamiento para caracterizar a los predios de acuerdo a las cepas circulantes. Se calcula la seroprevalencia intrapredial en cada muestreo de cada predio, y se determina si las variables están correlacionadas. No existe correlación entre predio con aislamiento y su seroprevalencia intrapredial para ese serogrupo. Tampoco

se encuentra correlación entre cepa circulante en el predio y niveles de excreción por orina.

## DISCUSIÓN

Para este trabajo se seleccionaron predios sin antecedentes de vacunación contra Leptospirosis. Esto fue indispensable dado que es sabido que el MAT no diferencia anticuerpos naturales de vaccinales (Musso y Lascola, 2013; OMSA, 2021), por lo que la vacunación afectaría los resultados y por ende su interpretación. En todos los predios se detectó la enfermedad, y las prevalencias a nivel individual fueron constantes en los diferentes períodos de muestreos.

La seroprevalencia encontrada a nivel individual fue inferior al último reporte realizado en ganadería. El cual data del 2005, en donde se reportó que las prevalencias individuales a nivel país varía entre 55 a 95% según el tamaño del predio (Repiso *et al.*, 2005). Por otro lado, los últimos datos de lechería estiman que en predios no vacunados la prevalencia a nivel individual es del 27,8% (Suanes *et al.*, 2024); en este último caso los serogrupos utilizados en la técnica de MAT fueron los mismo que los utilizados para el presente trabajo. Estas diferencias pueden deberse a los niveles de control que hay en cada tipo de sistema, si bien los sistemas intensivos como los lecheros tienen mayores tasas de transmisión, la vacunación es más frecuente, sobre todo en predios con asesoramiento veterinario (Suanes *et al.*, 2021), por lo que se asume un mayor control de la enfermedad.

La edad estuvo asociada a la seropositividad en el MAT, esto era esperable dado que es sabido que el riesgo de exposición aumenta con la edad y los títulos de anticuerpos pueden mantenerse en su punto de corte por años (Alder, 2015). Por otro lado, hubo una falta de correlación entre la edad y la qPCR, esto pudo deberse a que la excreción de la bacteria por orina se da de forma intermitente, por lo que estos resultados deben ser interpretados con

precaución. De hecho, solo en un bajo número de animales se detectó la bacteria en la orina durante los tres muestreos.

Hubo una baja correlación entre el MAT y el qPCR a nivel individual. Esto ya ha sido reportado por otros investigadores, en parte puede ser explicado por la intermitencia de la excreción de la bacteria por la orina, pero la incógnita sigue siendo discutida (Otaka *et al.*, 2012; Hamond *et al.*, 2014; Pinna *et al.*, 2018). Si bien múltiples trabajos reportan la falta de correlación entre ambas técnicas, es importante destacar que en el presente trabajo se realizaron hasta tres muestreos por animal, pudiendo haber influenciado en el hallazgo encontrado al aumentar la probabilidad de detectar un animal excretor.

Se reportaron mayores niveles de excreción en las vacas seropositivas al serogrupo Sejroe con respecto a las seropositivas al serogrupo Pomona, pudiendo asociarse a la presencia de infecciones del tipo crónicas, en donde la excreción renal de la bacteria perdura por más tiempo (Mughini-Gras *et al.*, 2014; Ellis, 2015). Cabe resaltar que en el caso de las vacas seropositivas al serogrupo Sejroe, los títulos estuvieron asociados a los resultados de qPCR, parecería indicar que infecciones más recientes son más propensas a la excreción bacteriana por orina.

Si bien la asociación entre los niveles de (sero)prevalencias intraprediales entre las técnicas de MAT y qPCR fue baja. El MAT podría ser utilizado como un posible indicador de los niveles de excreción en los rodeos, sobre todo cuando la proporción de animales seropositivos es elevada, por la implicancia que tiene en la salud pública (Sohm *et al.*, 2023). Estos hallazgos coinciden con los encontrados por otros investigadores, los cuales sugieren que el MAT es una herramienta muy útil para hacer diagnóstico a nivel de rodeo, pero no para realizar un diagnóstico a nivel individual sobre todo en infecciones crónicas, en estos casos suele ser más recomendable la utilización de métodos directos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011).

El aislamiento bacteriano es considerado la técnica gold-standard para el diagnóstico de leptospirosis (Picardeau, 2013). En este trabajo se logró aislar una gran variabilidad de cepas, demostrando lo endémica que es la

leptospirosis en los predios ganaderos. El último estudio donde se realizó aislamientos en campo fue el publicado por Zarantonelli *et al.* (2018), en donde aislaron un total de 40 cepas de *Leptospiras*. Dentro de estas, si bien en dos cepas pertenecientes a *Leptospira noguchii* no se determinó el serogrupo, las cepas restantes fueron aisladas también en el presente trabajo.

Hubo varios aislamientos con los que no se contaba con antecedentes en Uruguay. Uno de ellos fue *Leptospira noguchii* serogrupo Panamá. Este serogrupo fue aislado en Brasil en el año 2013 a partir de muestras de orina tomadas en bovinos en frigoríficos. A pesar de que este serogrupo es considerado del tipo incidental, la muestra fue tomada de animales aparentemente sanos (Martins *et al.*, 2015). Otro hallazgo importante fueron las cepas pertenecientes a la especie *L. santarosai*, si bien esta especie nunca había sido reportada en Uruguay, se ha publicado que está distribuida en todo el continente americano. Si bien falta estudiar el ciclo epidemiológico de esta especie, podrían tener varios reservorios, que pueden ir de roedores, marsupiales a animales domésticos (Chinchilla *et al.*, 2023). A pesar de que no se pudo determinar el serovar de estas cepas, es muy probable que la *Leptospira santarosai* serogrupo Sejroe sea perteneciente al serovar Guaricura, un serovar que se ha venido estudiando sobre todo en Brasil como posible serovar adaptado al huésped junto con Hardjobovis y Hardjoprajitno (Loureiro y Lilenbaum, 2020; Aymee *et al.*, 2022).

Cuando se evaluó la correlación entre el aislamiento y el MAT se observó que este último no era muy eficiente para predecir el serogrupo infectivo y/o circulante. A nivel individual, la concordancia entre serogrupo aislado y resultado de MAT (serogrupo específico) fue muy baja. Esto fue reportado también en Brasil, en donde se observó que solo el 12% (3/25) de las vacas eran seropositivas a su propio serogrupo (Libonati *et al.*, 2017). Es sabido que los bovinos generan una respuesta más bien del tipo celular como respuesta inmunitaria (Baldwin *et al.*, 2015) y, a la vez, las *Leptospiras* pueden generar biofilms cuando colonizan los túbulos renales evadiendo así la respuesta inmunitaria (Ristow *et al.*, 2008), esto explicaría parcialmente porque dan

seronegativos, pero no porqué dan reactivos a un serogrupo diferente del aislado.

Cuando se evaluó la correlación a nivel predial, no se encontró asociación entre los serogrupos aislados y las seroprevalencias del MAT por serogrupos. Si bien se ha establecido que el MAT es una herramienta muy útil para determinar el principal serogrupo circulante a nivel de rodeo (Hernández-Rodríguez *et al.* 2011), en este trabajo no se logró observar este comportamiento. Es importante tener en cuenta la gran variabilidad de aislamientos que encontramos, incluso dentro de un mismo predio. Dado que la sensibilidad del aislamiento bacteriano es baja (OMSA, 2021), es posible que hubiera más cepas circulantes en algunos predios, por lo que no se puede asegurar la eficiencia del MAT para este fin.

Para finalizar, se considera importante resaltar la implicancia que tienen estos hallazgos en la salud pública. Si bien los aislamientos se encontraron en animales clínicamente sanos, se pudo observar altos porcentajes de excreción en las vacas y una gran variabilidad de aislamientos, lo que desde el punto de vista de una salud es preocupante. Muchos de estos aislamientos son considerados como del tipo incidentales, pero la gran cantidad de cepas aisladas pone en duda el ciclo epidemiológico de esta enfermedad. Es por eso que es fundamental continuar estudiando la circulación de la leptospirosis en los rodeos y como interactúa con la salud pública. Las medidas de control se consideran necesarias desde este punto de vista, y la concientización de las personas que trabajan con estos animales también debería tenerse en cuenta.

## **CONCLUSIÓN**

El MAT resultó una herramienta útil para detectar animales excretores a nivel predial en rodeos no vacunados. Animales seropositivos por MAT al serogrupo Sejroe parecen tener mayores niveles de excreción con respecto a los seropositivos a Pomona. Este trabajo no logró asociar al MAT y qPCR con el aislamiento, pero pudo haber estado influenciado por la baja sensibilidad del aislamiento. Se encontró una gran variabilidad de cepas circulantes, incluso las identificadas como las de tipo incidentales en vacas preñadas

aparentemente sanas. Dado que la leptospirosis es endémica en el país se debería continuar estudiando el ciclo epidemiológico, con un enfoque de “una salud”.

## REFERENCIAS

1. Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
2. Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. <http://www.springer.com/series/82>
3. Aymée, L., Nogueira Di Azevedo, M. I., de Souza Pedrosa, J., Loria de Melo, J. dos S., Carvalho-Costa, F. A., & Lilenbaum, W. (2022). The role of *Leptospira* santarosai serovar Guaricura as agent of Bovine Genital Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109413>
4. Baldwin, C. L., & Telfer, J. C. (2015). The bovine model for elucidating the role of  $\gamma\delta$  T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Molecular Immunology*, 66(1), 35-47.
5. Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(5), 760–768. Wilson-Welder, J. H., Alt, D. P., Nally, J. E., & Olsen, S. C. (2021). Bovine Immune Response to Vaccination and Infection with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. *mSphere*, 6(2),
6. Chinchilla D, Nieves C, Gutiérrez R, Sordoillet V, Veyrier FJ, Picardeau M (2023) Phylogenomics of *Leptospira* santarosai, a prevalent pathogenic species in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis* 17(11).
7. Ellis WA. (1986). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. En: The Present State of Leptospirosis. Diagnosis and Control. Ellis W.A. & Little T.W.A., Dordrecht, Nijhoff, p. 13-24.

8. Ellis W.A. Animal leptospirosis. In: Adler B., editor. *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology (2015). 1st ed. Volume 387. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: pp. 99–137.
9. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. *Leptospira* and leptospirosis. MediSci, Melbourne. Australia, p. 259.
10. Fernandes, L. G. V., Stone, N. E., Roe, C. C., Goris, M. G. A., van der Linden, H., Sahl, J. W., Wagner, D. M., & Nally, J. E. (2022). *Leptospira sanjuanensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from soil in Puerto Rico. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 72(10).
11. Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A. P., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. Veterinary research communications, 38, 81-85.
12. Hathaway SC, Little TWA (1983). Epidemiological study of *Leptospira* Hardjo infection in second calf dairy cows. Vet Rec, 112(10):215-218.
13. Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C. A., Dalmau, E. A., & Quintero, G. M. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. In Journal of Microbiological Methods (Vol. 84, Issue 1, pp. 1–7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.021>
14. Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature reviews. Microbiology, 7(10), 736–747.
15. Leonard, F. C., Quinn, P. J., Ellis, W. A., & O'farrell, K. (1992). Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. The Veterinary Record, 131(19), 435-439.
16. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001;14: 296–326.

17. Levett PN. 2015. (Systematics of *Leptospiraceae*). En *Leptospira* and Leptospirosis, ed. por Adler B, 11-20. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
18. Libonati, H., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2017). Seronegativity of bovines face to their own recovered *Leptospiral* isolates. Microbial Pathogenesis, 108, 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.001>
19. Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. Theriogenology, 141, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
20. Martins, G., Loureiro, A. P., Hamond, C., Pinna, M. H., Bremont, S., Bourhy, P., & Lilenbaum, W. (2015). First isolation of *Leptospira* noguchii serogroups Panama and Autumnalis from cattle. Epidemiology & Infection, 143(7), 1538-1541.
21. Mughini-Gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., Patregnani, T., Lucchese, L. and Marangon, S., 2014. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds, Epidemiology and Infection, 142, 1172–1181.
22. Musso, D., & La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. Journal of microbiology, immunology, and infection, 46(4), 245–252.
23. Nieves Álvarez, C. J. (2018). Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación. DOI: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>
24. OMSA. (2021). Leptospirosis. <https://Leptospira.amc.nl/Leptospira-library>

25. OMSA (2022) Spanish - WHO PH Labs Webinar 220323 - Epidemiología y pruebas de diagnóstico de la leptospirosis. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=wQhCSwWA8lQ>
26. Otaka DY, Martins G, Hamond C, Penna B, Medeiros MA, Lilenbaum W (2012) Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet Rec* 170:338
27. Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. In *Medicine et Maladies Infectieuses* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
28. Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297-307. Ellis, W. A. (2015). Animal leptospirosis. *Leptospira and leptospirosis*, 99-137.
29. Pinna, M. H., Martins, G., Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2018). Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Tropical Animal Health and Production*, 50(4), 883–888. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1512-z>
30. Pinto, P. S., Pestana, C., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2017). Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. *Acta Tropica*, 172, 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
31. Repiso, M. V., Olivera, M. A., HerrEra, B., Silva, M., Guarino, H., Nuñez, A., Osawa, T., Fernández, L., Bañales, P., & Gil, A. (2002). Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. *INIA Serie Actividades de Difusión*, (288).
32. Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M. C., Lilenbaum, W., & Picardeau, M. (2008). Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology*, 154(5), 1309-1317.

33. Schreier, S., Dounghawee, G., Chadsuthi, S., Triampo, D., & Triampo, W. (2013). Leptospirosis: Current situation and trends of specific laboratory tests. In *Expert Review of Clinical Immunology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 263–280). <https://doi.org/10.1586/eci.12.110>
34. Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2023). A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. *One Health*, 100608.
35. Suanes, A., Macchi, V., Fernández, F., Salaberry, X., & Moreira, C. (2021). Características reproductivas, sanitarias y de manejo en establecimientos lecheros del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(215).
36. Suanes, A., Macchi, M. V., Fernández, F., Salaberry, X., Moreira, C., & Gil, A. D. (2024). Seroprevalence and herd-level associated factors of pathogenic *Leptospira spp.* circulating locally in dairy cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, 223, 106097.
37. 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.
38. 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).
39. Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, et al. (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 Negl Trop Dis* 12(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>.

## **CAPÍTULO IV: Vínculo epidemiológico entre bovinos y otras especies domésticas en sistemas ganaderos del Uruguay.**

### **RESUMEN**

La Leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por una espiroqueta del genero *Leptospira spp.* Está distribuida a nivel mundial y afecta a múltiples especies de sangre caliente. El ciclo epidemiológico de la bacteria es complejo, en donde la transmisión inter-especie juega un papel clave en la difusión de la infección. El objetivo de este trabajo fue reportar la asociación entre los niveles de seroprevalencia intrapredial de bovinos y los de ovinos, caninos, y equinos en predios ganaderos del Uruguay. Para eso se realizó un estudio observacional en 31 predios ganaderos sin antecedentes de vacunación de al menos un año a los bovinos. Entre los años 2020 a 2022 se colectaron muestras de suero en cada uno de los predios de 35 vacas, hasta 30 ovinos, hasta 10 equinos, y los caninos que vivieran en el lugar y tuvieran contacto con los bovinos. Además, se les hizo una encuesta a los veterinarios responsables del predio, en donde se recababan medidas de manejo asociadas a la enfermedad: co-pastoreo con ovinos, co-pastoreo con equinos, suplementación de bovinos con silo, fardo, y/o ración, existencia de potreros de animales enfermos dentro del predio, existencia de medidas para control de roedores. Los sueros fueron utilizados para el diagnóstico serológico de *Leptospira spp.* por medio de la prueba de microacglutinación (MAT). Se realizaron regresiones lineales para determinar la existencia de asociación entre las seroprevalencias intraprediales de cada especie en cada predio. Al final del estudio se muestrearon un total de 1081 vacas, 723 ovinos, 203 equinos y 93 caninos. Se determinó que la seroprevalencia intrapredial de *Leptospira spp.* para al menos un serogrupo fue de 39,5%(IC 95% 29,8-49,1%) para bovinos 76,9% (IC 95% 70,7-83,1%) para los ovinos; 95,7% (IC 95% 90,3-100%) para equinos; y 86,7% (IC 95% 77,9-95,4%) para el caso de los caninos. Se reportó una asociación entre la seroprevalencia intrapredial de bovinos y caninos a *Leptospira spp.* cuando se incluían todos los serogrupo en el análisis (coeficiente=0,39; p=0,01). Por otro lado, se encontró una

asociación entre la seroprevalencia intrapredial de los bovinos al serogrupo Sejroe y la de los equinos (coeficiente= 0,71;  $p<0,01$ ) y ovinos (coeficiente= 0,76;  $p=0,02$ ). No se encontró asociación entre la seroprevalencia intrapredial de los bovinos y los datos recabados en la encuesta. Se encontró una alta prevalencia a *Leptospira spp.* en los ovinos, equinos, y caninos. Está claro que estos animales juegan un rol en la epidemiología de la enfermedad, que impactan no solo en los bovinos, sino que también es un potencial riesgo para la salud pública. Es fundamental entonces implementar estrategias de monitoreo y control en entornos agrícolas y rurales para reducir el riesgo de transmisión y proteger la salud pública en las comunidades más expuestas.

*Palabras clave: animales domésticos, ciclo epidemiológico, vías de transmisión.*

## SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial disease caused by a spirochete of the genus *Leptospira spp.* It is globally distributed and affects multiple warm-blooded species. The epidemiological cycle of the bacterium is complex, with interspecies transmission playing a key role in the spread of the infection. This study aimed to report the association between the within-farm seroprevalence levels of bovines and those of sheep, dogs, and horses in cattle farms in Uruguay. An observational study was conducted on 31 cattle farms with no history of bovine vaccination for at least one year. Between 2020 and 2022, serum samples were collected from 35 cows per farm, up to 30 sheep, up to 10 horses, and all dogs living on the farm that had contact with the cattle. Additionally, a survey was conducted with the veterinarians responsible for each farm to gather management practices associated with the disease. The survey included information on co-grazing with sheep, co-grazing with horses, cattle supplementation with silage, hay, and/or feed, the presence of sick-animal paddocks within the farm, and rodent control measures. Serum samples were tested for *Leptospira spp.* using the microscopic agglutination test (MAT). Linear regressions were performed to determine the association between the within-farm seroprevalence of each species in each farm. By the end of the study, a total of 1081 cows, 723 sheep, 203 horses, and 93 dogs were sampled. The within-farm seroprevalence of *Leptospira spp.* for at least one serogroup was determined to be 39.5% (95% CI: 29.8–49.1%) in cattle, 76.9% (95% CI: 70.7–83.1%) in sheep, 95.7% (95% CI: 90.3–100%) in horses, and 86.7% (95% CI: 77.9–95.4%) in dogs. An association was reported between the within-farm seroprevalence of cattle and dogs to *Leptospira spp.* when all serogroups were included in the analysis (coefficient = 0.39;  $p = 0.01$ ). Additionally, an association was found between the within-farm seroprevalence of cattle for the Sejroe serogroup and that of horses (coefficient = 0.71;  $p < 0.01$ ) and sheep (coefficient = 0.76;  $p = 0.02$ ). No association was found between bovine seroprevalence and the farm management data collected in the survey. A high prevalence of *Leptospira spp.* was found in sheep, horses, and dogs. It is evident that these animals

play a role in the epidemiology of the disease, impacting not only cattle but also representing a potential public health risk. Therefore, it is essential to implement monitoring and control strategies in agricultural and rural environments to reduce the risk of transmission and protect public health in the most exposed communities.

*Keywords: domestic animals, epidemiological cycle, transmission pathways.*

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira spp.* Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, que afecta a la mayoría de los mamíferos domésticos y animales silvestres (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Su incidencia es mayor en países tropicales debido a las condiciones de humedad y temperatura que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, propiciando así la transmisión de la enfermedad (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001; Costa *et al.*, 2015). La *Leptospira* tiene un gran potencial para persistir en el ambiente, dado su capacidad para formar biofilms, es por eso que la tasa de transmisión es elevada, contribuyendo a la transmisión inter-especie (Davignon *et al.*, 2023).

La infección de esta bacteria puede darse en casi cualquier especie de sangre caliente, habiendo especies más susceptibles. Un punto crítico en el desarrollo de la infección es el tipo de serovar infectivo. Hay serovares que están adaptados al huésped, en estos casos la infección suele cursarse de forma asintomática; y no adaptados al huésped, o incidentales, en donde la infección puede causar sintomatología aguda. Este factor es clave en el ciclo epidemiológico de la enfermedad, ya que los animales infectados por serovares adaptados al huésped suelen ser portadores renales, siendo los principales transmisores (Ko *et al.*, 2009; Davignon *et al.*, 2023).

En Uruguay, es sabido que los sistemas ganaderos suelen ser más bien del tipo extensivo, en donde los bovinos conviven con otras especies de animales domésticos como los equinos, ovinos y caninos. En Latinoamérica, se han realizado múltiples investigaciones en estas especies domésticas (Pinto *et al.*, 2017), en donde se reporta no solo desarrollo de la forma aguda de la enfermedad (Hamond *et al.*, 2024), sino que también afecciones más del tipo crónica, incluyendo las afecciones reproductivas (Hamond *et al.*, 2013; Polle *et al.*, 2014; Tonin *et al.*, 2015). Si bien hay varios trabajos en donde se estudia en conjunto varias especies domésticas dentro de los predios bovinos (Campos *et al.*, 2017; dos Santo *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2017; Dreyfus *et*

*al.*, 2018), hay poca información del rol que juegan estas especies en la infección en los bovinos.

En el caso de los ovinos, el último estudio de leptospirosis que se realizó en Uruguay data de 1971. Se tomaron muestras de suero de 289 ovinos provenientes de frigorífico, reportándose que el 10,38% eran seropositivos a MAT utilizándose un punto de corte de 1/100 (Caffarena *et al.*, 1971). En equinos y caninos se realizó un estudio vinculado a humanos seropositivos. Se muestrearon 50 caninos y 22 equinos, siendo seropositivos el 16 y 50% respectivamente, con un punto de corte de 1/100 (Meny *et al.*, 2019).

Dada esta información, se considera necesario estudiar el impacto que tienen las especies domesticas en la infección por *Leptospira spp.* en bovinos de carne. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue reportar la asociación entre los niveles de seroprevalencia intrapredial de bovinos y los de ovinos, caninos, y equinos en predios ganaderos del Uruguay.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Diseño del estudio*

Se realizó un estudio observacional en 31 predios ganaderos, siendo seleccionados por conveniencia. Los predios debían de cumplir las siguientes condiciones: sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis en los últimos cinco años, el uso de ultrasonografía para el diagnóstico de gestación, y el mantenimiento de registros de información confiables. Para esto se contó con la colaboración de 13 veterinarios de libre ejercicio que estuvieran vinculados a dichos predio. El muestreo se realizó durante el 2020 a 2022 en todo Uruguay.

En cada uno de los predios, los veterinarios de libre ejercicio realizaban la ecografía para el diagnóstico de gestación. Se seleccionaban aleatoriamente 25 vacas que estuvieran en el primer tercio de su gestación y 10 vacas falladas o vacías. Por otro lado, se seleccionaron en cada predio hasta 30 ovinos, 10 equinos y la totalidad de los caninos que tuviera el establecimiento. A todos los animales seleccionados se les tomaba muestras de sangre.

Se les realizaba una encuesta a los veterinarios, de forma de recolectar información de los predios. Consistía en una serie de preguntas cerradas, a las cuales se debía contestar si/no: co-pastoreo con ovinos, co-pastoreo con equinos, suplementación de bovinos con silo, suplementación de bovinos con fardo, suplementación de bovinos con ración, existencia de potreros de animales enfermos dentro del predio, existencia de medidas para control de roedores.

#### *Toma de muestras y análisis de laboratorio*

Se colectaron muestras de sangre mediante venopunción de la vena coccígea (bovinos), yugular (ovinos y equinos), o cefálica (caninos) en tubos sin anticoagulante, y se transportaron refrigeradas. Los sueros fueron luego almacenados a -20 °C.

Las muestras de suero se emplearon para evaluar los títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* utilizando la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT, por sus siglas en inglés), siguiendo protocolos establecidos (Faine *et al.*, 1999). Los puntos de corte utilizados variaron según la especie animal, en bovinos se utilizó 1/200, en ovinos y canino 1/50, y en equino 1/100. El panel de antígenos utilizado consistió en cepas locales de los serogrupos: Sejroe, Pomona, Autumnalis, Australis, Pyrogenes y Canicola; además de dos cepas locales no identificadas de la especie *noguchii* (Zarantonelli *et al.*, 2018). Para este último caso, una muestra era considerada como positiva para *L. noguchii* si mostraba reactividad con al menos una de las cepas.

#### *Análisis de datos*

Se realizaron regresiones lineales a nivel predial utilizando el programa STATA/IC 2015 (StataCorp, 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). Como variable dependiente fue tomada la seroprevalencia intrapredial de los bovinos, mientras que las variables independientes a considerar fueron: seroprevalencia intrapredial de los ovinos, seroprevalencia intrapredial de los equinos, seroprevalencia intrapredial de los caninos, y los datos recabados en la encuesta anteriormente mencionados.

Se analizaron un total de ocho modelos, uno por cada serogrupo y una general (LGen), en donde se consideraba positivo un animal cuando daba reactivo a al menos un serogrupo. Las seroprevalencias intraprediales se calculaba en base al número de animales positivos sobre el total de animales muestreados para cada especie en cada predio.

En caso de que un animal diera seropositivo a más de un serogrupo (coaglutinaciones), se consideraba como positivo únicamente el serogrupo con el título más alto. A excepción de los casos en que el título más alto fuera compartido entre serogrupo, en donde se mantenía la seropositividad al conjunto de serogrupos.

Para cada modelo se realizó un análisis univariado inicial, para evaluar la fuerza de la asociación entre la variable dependiente y las variables independientes. Las covariables que mostraron valores de  $p \leq 0,2$  en la prueba-t se consideraron para su posible inclusión en el modelo multivariado. Se evaluó la colinealidad entre variables utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Si dos variables mostraban un coeficiente de correlación mayor de 0,7, se conservaba la variable más fuertemente relacionada con el resultado para un análisis posterior.

Los análisis multivariados de regresión lineal se construyeron manualmente utilizando el método forward. Las variables se añadieron a los modelos en función de la significancia de los valores de  $p$  derivados de la prueba-t. La significancia del modelo completo se determinó utilizando la prueba-F de la tabla de análisis de varianza (ANOVA). El R-cuadrado ajustado también se lo utilizó para comparar la capacidad predictiva del modelo a medida que se incorporaban variables.

En cada uno de los modelos se chequeaba la existencia de los cuatro criterios necesarios que debe cumplir una regresión lineal: independencia, linealidad, homocedasticidad y distribución normal de los residuos. Se consideró en todos los casos que los valores de las variables dependientes eran independientes entre sí. Por otro lado, la linealidad se comprobaba realizando un gráfico de los residuos estandarizados sobre cada variable predictora. Para

la homocedasticidad se utilizó el test de Breusch-Pagan y Cook-Weisberg. Este test permite verificar si la varianza de los errores es constante (hipótesis de homocedasticidad) o si varía en función de alguna variable, lo que indicaría heterocedasticidad. Para evaluar la normalidad de los residuos en el modelo de regresión, se utilizó el test de simetría y curtosis (sktest). Este test evalúa dos aspectos de la distribución de los residuos: la simetría (mediante la prueba de skewness) y la curtosis (mediante la prueba de kurtosis), también se realizaba el qq-plot para tener una mejor visualización de los resultados.

En caso que alguna de las variables predictoras continuas no se ajustara a estos criterios se intentaba realizar una transformación de la variable, y de no ser posible la asociación era descartada.

## RESULTADOS

### *Descripción de datos*

Al finalizar el estudio se muestrearon un total de 1081 vacas, 723 ovinos, 203 equinos y 93 caninos. En 26 de los predios se muestrearon ovinos (cinco no tenían dicha especie), mientras que en 30 se muestrearon tanto caninos como equinos. En el caso de los ovinos se muestrearon una mínima de siete y máxima de 32 animales por predio. En equinos una mínima de uno y máxima de 11 animales por predio; y en caninos una mínima de uno y máxima de ocho animales por predio. Los resultados de la encuesta que se le realizó a los veterinarios en cada predio se reportan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Datos basados en encuesta realizada a los veterinarios de libre ejercicio en 31 predios ganaderos de Uruguay

| Variable                                   | Proporción (%) | n predios |
|--------------------------------------------|----------------|-----------|
| Co-pastoreo con ovinos                     | 83,9           | 26        |
| Co-pastoreo con equinos                    | 67,7           | 21        |
| Suplementación de bovinos                  |                |           |
| Ración                                     | 22,6           | 7         |
| Silo                                       | 6,45           | 2         |
| Fardo                                      | 35,5           | 11        |
| Existencia de potrero de animales enfermos | 67,7           | 21        |
| Control de roedores                        | 35,5           | 11        |

Previo a la interpretación de los resultados del MAT se debió trabajar con las co-aglutinaciones. El 20,5%, 40,0%, y 19,4% de los ovinos, equinos y caninos, respectivamente, presentó co-aglutinaciones. Luego de mantener únicamente seropositivo el serogrupo con el título más alto (en los casos en que eso era posible) se determinó que la seroprevalencia intrapredial de *Leptospira spp.* para al menos un serogrupo fue de 76,9% (IC 95% 70,7-83,1%) para los ovinos; 95,7% (IC 95% 90,3-100%) para equinos; y 86,7% (IC 95% 77,9-95,4%) para el caso de los caninos. En cuanto a los bovinos, el 6,7% presentó co-aglutinaciones, y la seroprevalencia intrapredial de *Leptospira spp.* para al menos un serogrupo fue de 39,5% (IC 95% 29,8-49,1%). En la tabla 2. Se muestran los resultados de seroprevalencia intrapredial por especie y por serogrupo.

**Tabla 2.** Proporción de animales seropositivos a MAT por predio (seroprevalencia intrapredial) según serogrupo de *Leptospira spp.*

| Serogrupo          | Bovinos |               | Ovinos  |               | Equinos |               | Caninos |               |
|--------------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|
|                    | Media*  | IC 95%        | Media * | IC 95%        | Media * | IC 95%        | Media*  | IC 95%        |
| Sejroe             | 33,6    | [22,3 - 43,5] | 9,4     | [7,3 - 11,5]  | 18,7    | [13,3 - 24,1] | 26,9    | [17,7 - 36,1] |
| Pomona             | 3,2     | [1,5 - 5,0]   | 5,8     | [4,1 - 7,5]   | 9,4     | [5,3 - 13,4]  | 4,3     | [1,0 - 8,5]   |
| Australis          | 1,5     | [0 - 3,2]     | 15,1    | [12,5 - 17,7] | 44,3    | [37,4 - 51,2] | 29,0    | [19,6 - 38,4] |
| Autumanalis        | 0,6     | [0,2 - 1,1]   | 45,6    | [42,0 - 49,2] | 54,7    | [47,8 - 61,6] | 21,5    | [13,0 - 30,0] |
| Canicola           | 1,5     | [0 - 3,2]     | 5,5     | [3,8 - 7,2]   | 14,3    | [9,4 - 19,1]  | 20,4    | [12,1 - 28,7] |
| Pyrogenes          | 0       | -             | 5,3     | [3,6 - 6,9]   | 1,5     | [0 - 3,1]     | 3,2     | [0 - 6,9]     |
| <i>L. noguchii</i> | 0,4     | [0 - 0,7]     | 15,1    | [12,5 - 17,7] | 11,3    | [6,9 - 15,7]  | 0       | -             |

Puntos de corte: bovinos 1/200; equinos 1/100; ovinos y canino 1/50.

\*Media: valores expresados en porcentaje (%).

IC95%: intervalo de confianza del 95%

### *Análisis estadístico*

En el análisis univariado, se encontró correlación con la variable de respuesta en cuatro de los ocho modelos reportados. Estos modelos fueron: LGen,

Australis, Sejroe y Canicola (Tabla 3). En los modelos restantes no se encontró asociación con ninguna variable. Tampoco se encontró asociación con las variables recabadas en la encuesta a los veterinarios. No hubo correlación entre variables independientes.

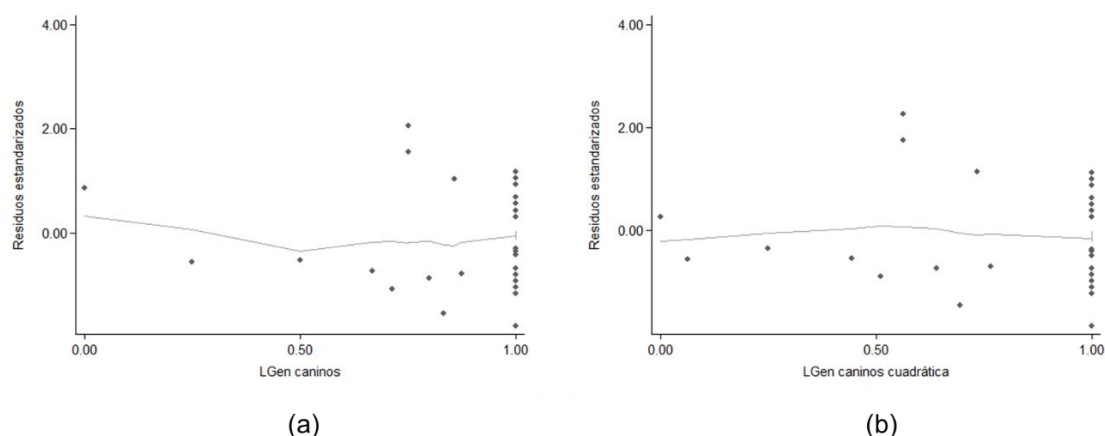
**Tabla 3.** Análisis univariado de variables independientes asociadas a seroprevalencias intraprediales de *Leptospira spp.* según MAT en predios ganaderos del Uruguay

| Modelos          | Variables                            | valor-p |
|------------------|--------------------------------------|---------|
| <b>LGen</b>      | Seroprevalencia intrapredial ovinos  | 0,66    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial equinos | 0,74    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial caninos | 0,01    |
| <b>Australis</b> | Seroprevalencia intrapredial ovinos  | 0,19    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial equinos | 0,68    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial caninos | 0,03    |
| <b>Sejroe</b>    | Seroprevalencia intrapredial ovinos  | 0,07    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial equinos | < 0,01  |
|                  | Seroprevalencia intrapredial caninos | 0,05    |
| <b>Canicola</b>  | Seroprevalencia intrapredial ovinos  | 0,03    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial equinos | 0,43    |
|                  | Seroprevalencia intrapredial caninos | < 0,01  |

LGen: Se consideraba positivo un animal cuando daba reactivo al menos a un serogrupo en el MAT

En el modelo multivariado LGen la única variable que se incorporó al modelo fue la seroprevalencia intrapredial de caninos. En este caso, la variable independiente no cumplía con el criterio de linealidad, pero luego de hacerle una transformación cuadrática se mejoraron los resultados (Figura 1). El

coeficiente de la variable independiente seroprevalencia intrapredial de caninos elevado al cuadrado en el modelo LGen se estimó en 0,39 ( $p=0,01$ ) y el *intercept* en 0,09 ( $p=0,5$ ). El modelo final resultó significativo con un valor  $p=0,01$ . El R-cuadrado ajustado fue de 0,18.



**Figura 1.** Gráfico de residuos estandarizados sobre variables independientes de modelos de regresión lineal. La variable dependiente es seroprevalencia intrapredial de bovinos seropositivos al menos un serogrupo de *Leptospira* en MAT (LGen) y la variable independiente es la seroprevalencia intrapredial LGen (a) y la seroprevalencia intrapredial LGen elevada al cuadrado (b).

En el modelo del serogrupo Sejroe, se determinó que tanto la seroprevalencia de ovinos y equinos en un predio está asociada a la seroprevalencia intrapredial de los bovinos para este serogrupo (Tabla 4). El modelo final resultó significativo con un valor  $p<0,01$ . El R-cuadrado ajustado fue de 0,3685, lo que indica que el 36,8% de la variabilidad de la seroprevalencia intrapredial de los bovinos para este serogrupo es explicada por las variables incluidas en el modelo. Aunque esta proporción de variabilidad explicada es moderada, sugiere que el modelo tiene un ajuste razonable.

**Tabla 4.** Modelo de regresión lineal para evaluar asociación entre seroprevalencia intrapredial de bovinos y otras especies domesticas para el serogrupo Sejroe en predios ganaderos en Uruguay.

| Variables | Coeficiente | 95% IC | valor-p |
|-----------|-------------|--------|---------|
|-----------|-------------|--------|---------|

|                                                                      |      |              |        |
|----------------------------------------------------------------------|------|--------------|--------|
| <b>Seroprevalencia intrapredial para serogrupo Sejroe en ovinos</b>  | 0,76 | 0,12 – 1,39  | 0,02   |
| <b>Seroprevalencia intrapredial para serogrupo Sejroe en equinos</b> | 0,71 | 0,28 – 1,15  | < 0,01 |
| <b>Intercept</b>                                                     | 0,12 | -0,01 - 0.25 | 0,06   |

95% IC: 95% intervalo de confianza.

Para el caso de los dos modelos restantes (serogrupo Australis y Canicola), los modelos multivariados finales no cumplieron los criterios de linealidad ni homocedasticidad, por lo que fueron desestimados.

## DISCUSIÓN

La seroprevalencia de leptospirosis en equinos, ovinos y caninos en el presente estudio fue mayor al reportado por Caffarena *et al.* (1971). De todas maneras, hubo varias diferencias además de las temporales a tener en cuenta, tales como el punto de corte de la técnica, el tipo de muestreo y el panel de antígenos utilizado en cada estudio. Reportaron una seroprevalencia del 10,38% en ovinos, 51,82% en equinos y 23,63% en caninos (Caffarena *et al.*, 1971). Tanto para el caso de los equinos como ovinos, las muestras tomadas fueron únicamente de frigoríficos, mientras que los caninos analizados fueron del departamento de Montevideo, siendo las condiciones epidemiológicas muy diferentes a los caninos rurales como fue en este caso.

En el estudio realizado por Meny *et al.* (2019) en Uruguay las seroprevalencias reportadas también fueron inferiores, pero este estudio tenía un menor número de muestras, ya que el objetivo era a nivel de salud pública. En el estudio realizado en 2019 se colectó suero de 50 caninos y 22 equinos, siendo seropositivos el 16 y 50% respectivamente, con un punto de corte de 1/100. El muestreo principal fue realizado en trabajadores de tambo y de plantaciones de arroz, así como en veterinarios, habitantes de asentamientos y recicladores de residuos. La mayor proporción de seropositivos se dio en el

caso de los perros en las zonas de los recicladores de residuos y en el de los equinos en las plantaciones de arroz (Meny *et al.*, 2019).

En Latino América se realizó una revisión sistemática en perros, suinos y equinos. Se vio que el serogrupo más prevalente fue Canicola en caninos, e Icterohaemorrhagiae en suinos y equinos (Pinto *et al.*, 2017). Utilizando un total de 45 estudios de diferentes países de Latino América, se estableció que la prevalencia en caninos tuvo un rango de 4,9 a 72% (mediana 20,1%). En los equinos se utilizaron un total de 23 estudios de seroprevalencia, siendo el rango de seroreactividad a nivel individual de 4,5 a 90,7% (mediana 45%) (Pinto *et al.*, 2017).

Se consideró necesario tener en cuenta las co-aglutinaciones, ya que se observó una gran proporción de estos casos, sobre todo en los equinos. Esto se ha reportado en varios trabajos en donde se analizaron varias especies animales, por ejemplo, en Brasil se reportó un 14,9% de co-aglutinaciones (Campos *et al.*, 2017) en este caso se muestrearon bovinos, ovinos y caprinos; mientras que en otro trabajo se observó un 36,84% de co-aglutinaciones en ovinos (Tonin *et al.*, 2015). Esta es una problemática muy frecuente que tiene la técnica, sobre todo en algunas especies de animales domésticos, y es necesario ajustarlo ya que de lo contrario la proporción de seropositivos en cada serogrupo no sería confiable.

Si bien hay varios reportes en donde se ha estudiado la serología en varias especies animales (Campos *et al.*, 2017; dos Santo *et al.*, 2017; Dreyfus *et al.*, 2018), la asociación entre dicha serología no siempre es tomada en cuenta. En Brasil se muestrearon un total de 336 ovinos, 292 cabras y 253 bovinos pertenecientes a 33 predios. La seroprevalencia en bovinos, ovinos y cabras correspondió a 50,5, 40,5 y 34,6% respectivamente, con un punto de corte de 1:100 en el MAT. Los serogrupos más seroprevalentes fueron Sejroe para bovinos, e Icterohaemorrhagiae para ovinos y caprinos (Campos *et al.*, 2017). A pesar de que se realizó un estudio de factores asociados en donde se encontró asociación con características predial de manejo (pastoreo, fuente de agua, asesoramiento veterinario) y tipo de sistema (sistemas de producción de carne) la interacción inter-especie no se tuvo en cuenta. De forma similar,

en Nueva Zelanda se estudiaron 238 predios, tomándose 20 muestras de bovinos, ovinos y ciervos en caso que hubiera. Se reportó que el serogrupo más prevalente para las tres especies fue Sejroe. Usaron en el panel de antígeno Pomona y Sejroe, y un punto de corte de 1/48. En bovinos la seroprevalencia fue de 43,6% y 14,1% para Sejroe y Pomona respectivamente. Para ovinos fue de 45,6% y 19,6% respectivamente (Dreyfus *et al.*, 2018).

Se encontró una asociación entre la seroprevalencia intrapredial de bovinos y la de ovinos y equinos en el serogrupo Sejroe, el cual es el más prevalente en bovinos y se lo ha asociado con afecciones reproductivas (Capítulo I). Este vínculo puede indicar un posible ciclo epidemiológico común para estos animales en ciertas áreas, ya que Sejroe ha sido identificado como serogrupo patógeno en diferentes especies de mamíferos, con implicaciones importantes para la salud reproductiva del ganado bovino (Junqueira *et al.*, 2006; Fávero *et al.*, 2017; Libonati *et al.*, 2018; Loureiro y Lilenbaum, 2020).

Un resultado que llamó la atención fue que, tanto en ovino como en equinos, los serogrupos más seroprevalentes fueron Australis y Autumnalis. Si bien era esperable en caso de los equinos, ya que son huéspedes de mantenimiento del serovar Bratislava del serogrupo Australis (Polle *et al.*, 2014). Los equinos demostraron una susceptibilidad considerable a la leptospirosis, aunque muchas infecciones en esta especie permanecen asintomáticas (Polle *et al.*, 2014). Los serogrupos más seroprevalentes suelen variar de acuerdo a la locación de los equinos, por ejemplo, en caballos urbanos se ha reportado que el serogrupo más seroprevalente es el Icterohaemorrhagiae, dado el contacto con orina de roedores. Parecería ser que la susceptibilidad del equino lleva a que la transmisión de estos animales juegue un rol importante en la epidemiología de la enfermedad (Hamond *et al.*, 2013).

La leptospirosis en ovinos continúa siendo relevante remarcando los altos niveles de seroprevalencia encontrados, aunque la mayoría de las infecciones parecen cursar asintomáticas o con síntomas leves en esta especie (Alder, 2015). Estudios previos, sugieren que el serogrupo Sejroe está asociado a problemas reproductivos en ovinos (Tonin *et al.*, 2015). Esto se alinea con los

hallazgos de este estudio, destacando la importancia de considerar a los ovinos como potenciales reservorios de serovares patógenos de *Leptospira*.

Considerando el diagnóstico serológico con todos los serogrupos de *Leptospira* de forma conjunta (modelo LGen), se encontró una asociación entre la seroprevalencia intrapredial de bovinos y la de caninos, lo que sugiere un vínculo epidemiológico. Aunque el R-cuadrado ajustado fue bajo, esta relación indica la necesidad de estudios adicionales para explorar el papel de los perros en la dinámica de transmisión de leptospirosis en entornos rurales. Otros estudios han señalado que, aunque el contacto entre perros y ganado puede ser ocasional, los perros podrían actuar como reservorios o facilitadores de la infección en ciertos escenarios (Mwachui *et al.*, 2015; Fávero *et al.*, 2017). El serogrupo más seroprevalente en esta especie fue Australis, lo que coincide con un estudio realizado en 180 perros en entornos rurales en Brasil (dos Santo *et al.*, 2017).

La presencia de animales silvestres en el ciclo epidemiológico de la leptospirosis es un factor que merece mayor atención. Si bien en este trabajo no se pudieron tener en cuenta, seguramente sean una variable fundamental a la hora de interpretar los resultados. La literatura indica que varias especies de mamíferos pueden actuar como reservorios naturales para *Leptospira*, y su rol en la transmisión inter-especie es clave, especialmente en entornos donde la fauna silvestre interactúa con animales domésticos (Vieira *et al.*, 2017; Vieira y Lilenbaum, 2017; Davignon *et al.*, 2023).

Finalmente, la alta seroprevalencia de *Leptospira* en especies domésticas, particularmente en equinos y caninos, representa una preocupación en salud pública significativa debido a su estrecho contacto con humanos. La transmisión de *Leptospira* a personas suele ser ocupacional, especialmente en trabajadores rurales y personal en contacto frecuente con animales, sobre todo en zonas húmedas y con condiciones sanitarias deficientes (Ullmann y Langoni, 2011). En este contexto, un estudio realizado en Uruguay encontró que, de una muestra de 308 personas entre trabajadores de tambos, plantaciones de arroz, veterinarios, habitantes de asentamientos y

recicladores de residuos, el 45% resultó seropositivo. Los factores asociados fueron el contacto con animales y el uso de agua insegura (Meny *et al.*, 2019). La leptospirosis, además, persiste eficazmente en el ambiente debido a la capacidad de *Leptospira* para formar biofilms, lo cual eleva su potencial de transmisión y facilita la propagación entre especies (Davignon *et al.*, 2023). Dado que la transmisión a humanos ocurre por contacto directo o indirecto con orina contaminada, el control de roedores en áreas de almacenamiento de alimentos es fundamental para la prevención de la enfermedad (Tilahun *et al.*, 2013). Por otro lado, un estudio en 127 predios rurales reportó que el 6,6% de los productores eran seropositivos, señalando la asistencia en el parto y la proporción de áreas inundables en el predio como factores de riesgo significativos (Sanhueza *et al.*, 2016).

## CONCLUSIÓN

Se reportó un alto número de animales seropositivos a *Leptospira spp.* en ovinos, caninos y equinos de predios ganaderos del Uruguay. Encontrándose una asociación entre las seroprevalencias intraprediales de estas especies domésticas y los bovinos en cada predio. Está claro que estos animales juegan un rol en la epidemiología de la enfermedad, que impactan no solo en los bovinos, sino que también es un potencial riesgo para la salud pública. Es fundamental entonces implementar estrategias de monitoreo y control en entornos agrícolas y rurales para reducir el riesgo de transmisión y proteger la salud pública en las comunidades más expuestas.

## REFERENCIAS

1. Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. <http://www.springer.com/series/82>
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.
3. Caffarena, R. M., Cacchione, R. A., Cascelli, E. S., & Martinez, E. S. (1971). Developments in leptospirosis in Uruguay.

4. Campos, Â. P., Miranda, D. F. H., Rodrigues, H. W. S., da Silva Carneiro Lustosa, M., Martins, G. H. C., Mineiro, A. L. B. B., Castro, V., Azevedo, S. S., & de Sousa Silva, S. M. M. (2017). Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(5), 899–907. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1255-2>
5. 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.
6. Davignon, G., Cagliero, J., Guentas, L., Bierque, E., Genthon, P., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Kainiu, M., Laporte-Magoni, C., Picardeau, M., Selmaoui-Folcher, N., Soupé-Gilbert, M. E., Tramier, C., Vilanova, J., Wijesuriya, K., Thibeaux, R., & Goarant, C. (2023). Leptospirosis: toward a better understanding of the environmental lifestyle of *Leptospira*. In *Frontiers in Water* (Vol. 5). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/frwa.2023.1195094>
7. dos Santos, L. F., Guimarães, M. F., de Souza, G. O., da Silva, I. W. G., Santos, J. R., Azevedo, S. S., Labruna, M. B., Heinemann, M. B., & Horta, M. C. (2017). Seroepidemiological survey on *Leptospira spp.* infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(8), 1715–1722. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1382-9>
8. Dreyfus, A., Wilson, P., Benschop, J., Collins-Emerson, J., Verdugo, C., & Heuer, C. (2018). Seroprevalence and herd-level risk factors for seroprevalence of *Leptospira spp.* in sheep, beef cattle and deer in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 66(6), 302–311. <https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1507770>
9. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. (1999) Melbourne, Australia, MediSci.

10. Fávero, J. F., de Araújo, H. L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A. A., Baldissera, M. D., Stefani, L. M., & da Silva, A. S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial Pathogenesis*, 107, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>
11. Flores, B. J., Pérez-Sánchez, T., Fuertes, H., Sheleby-Elías, J., Múzquiz, J. L., Jirón, W., Duttmann, C., & Halaihel, N. (2017). A cross-sectional epidemiological study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. *Acta Tropica*, 170, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.031>
12. Hamond, C., Martins, G., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2013). The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. *Epidemiology and Infection*, 141(1), 33–35. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000416>
13. Hamond, C., Silveira, C. S., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Salaberry, X., Aráoz, V., Costa, R. A., Rivero, R., Giannitti, F., & Zarantonelli, L. (2024). *Infección aguda por Leptospira interrogans serovar kennewicki en corderos*.
14. Junqueira, R. C., C de Freitas, J., F Alfieri, A., & A Alfieri, A. (2006). Reproductive performance evaluation of a beef cattle herd naturally infected with the BoHV-1, BVDV and *Leptospira hardjo*. *Semina Ci. agr.*, 471-480.
15. Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(10), 736–747.
16. Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology*, 14(2), 296–326.
17. Libonati, H. A., Santos, G. B., Souza, G. N., Brandão, F. Z., & Lilenbaum, W. (2018). Leptospirosis is strongly associated with estrus repetition in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1625-1629.

18. Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47.
19. Meny, P., Menéndez, C., Ashfield, N., Quintero, J., Rios, 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 Microbiologia*, 51(4), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.005>
20. Mwachui, M. A., Crump, L., Hartskeerl, R., & Zinsstag, J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission : A Systematic Review. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843>
21. Pinto, P. S., Libonati, H., & Lilenbaum, W. (2017). A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 49, Issue 2, pp. 231–238). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1201-8>
22. Polle, F., Storey, E., Eades, S., Alt, D., Hornsby, R., Zuerner, R., & Carter, R. (2014). Role of Intraocular *Leptospira* Infections in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis in the Southern United States. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11–12), 1300–1306. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.09.010>
23. Sanhueza, J. M., Heuer, C., Wilson, P. R., Benschop, J., & Collins-Emerson, J. M. (2017). Seroprevalence and Risk Factors for *Leptospira* Seropositivity in Beef Cattle, Sheep and Deer Farmers in New Zealand. *Zoonoses and Public Health*, 64(5), 370–380. <https://doi.org/10.1111/zph.12317>
24. Tilahum, Z., Reta, D., & Simenew, K. (2013). Global Epidemiological Overview of Leptospirosis. *International Journal of Microbiological Research*, 4(1), 09–15. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.1.7134>
25. Tonin, A. A., Martins, B., Zago, R. V. M. S., Tochetto, C., Azenha, N. P., Schaefer, P. C., Martins, J. L. R., & Badke, M. R. T. (2015). Outbreak of leptospirosis: reproductive losses in sheep. *Comparative Clinical Pathology*, 24(4), 961–965. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2056-x>

26. Ullmann, L. S., & Langoni, H. (2011). Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(2), 119–129. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000200002>
27. Vieira, A. S., & Lilenbaum, W. (2017). Leptospirosis on captive wild animals in Latin America. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 115, pp. 496–500). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.001>
28. Vieira, A. S., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2018). A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 50, Issue 2, pp. 229–238). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1429-y>

## CONCLUSIONES GENERALES

Como se ha reportado ya en otros trabajos realizados en Uruguay, se observó que la leptospirosis estaba ampliamente distribuida en los predios ganaderos estudiados. Si bien el endemismo encontrado era esperable, la proporción de animales excretores (qPCR positivos) es algo que debe tenerse presente.

Los serogrupos más seroprevalentes fueron Sejroe y Pomona, observándose una muy baja proporción de animales reactivos a los otros serogrupos estudiados. Estos dos serogrupos, se los encontró asociados a afecciones reproductivas, y de una forma que se correlaciona con el ciclo epidemiológico de la enfermedad. El serogrupo Sejroe se sabe contiene los serovares adaptados a los bovinos (Hardjo bovis y Hardjo praetense), y suele ocasionar afecciones del tipo crónicas en los bovinos. Las pérdidas tempranas en los bovinos, sobre todo fallas en la concepción con repetición de celo y muertes embrionarias tempranas, están asociadas fundamentalmente a estos serovares. El qPCR también se lo vio asociado, lo que sugiere una mayor proporción de animales infectados de forma crónica. Animales seropositivos por MAT al serogrupo Sejroe parecen tener mayores niveles de excreción con respecto a los seropositivos a Pomona.

El aborto es una de las afecciones más estudiadas cuando se habla de Leptospirosis. Si bien se esperaba un mayor número de abortos para realizar este estudio, se pudo observar una correlación con el serogrupo Pomona, lo que sugiere que este serogrupo sí está afectando las tasas de parición, a pesar del gran endemismo. De todas maneras, debe tenerse en cuenta que el aborto a nivel de rodeo muchas veces es multifactorial, y dentro de las causas a tener en cuenta, la Neosporosis no debe ser pasada por alto dada la gran difusión de este agente.

Tanto el diagnóstico serológico como el molecular resultaron ser un desafío cuando se los intenta correlacionar, no solo con animales infectados, sino con la cepa circulante en el predio. El MAT resultó una herramienta útil para detectar animales excretores a nivel predial en rodeos no vacunados. Pero no para detectar serogrupo infectivo a nivel individual. Si bien a nivel predial

tampoco se pudo asociar el MAT con el serogrupo circulante, es importante destacar que la cepa circulante se determinaba por medio del cultivo bacteriano, y se sabe esta técnica presenta una baja sensibilidad. Teniendo en cuenta la gran variabilidad de cepas circulantes, es posible que en un mismo predio hubiera más cepas circulantes que no se pudieron aislar, por lo que con esta metodología es difícil estimar la sensibilidad del MAT para este uso.

Se encontró una gran variabilidad de cepas circulantes, incluso las identificadas como las de tipo incidentales en vacas preñadas aparentemente sanas. Se reportaron cepas nunca aisladas en el país, pero si presentes en la región, como las correspondientes a la especie *L. Santarosai* y la *L. Noguchii* serogrupo Panama. Estos hallazgos resaltan el gran endemismo que tiene la leptospirosis en Uruguay, ya que vacas infectadas por serovares del tipo incidentales no tuvieron signos clínicos visibles, parieron terneros clínicamente sanos, y los títulos serológicos para esos serogrupos se mantuvieron bajos o incluso seronegativos, lo que sugiere una baja respuesta inmunitaria ante estas cepas y/o infecciones de tipo crónicas.

Un resultado que debe remarcarse de este trabajo, es el realizado en otras especies domésticas. A nivel país había muy poca información al respecto, y se observó una gran proporción de seropositivos tanto en ovinos, equinos, como caninos. Esto sugiere que estas especies domésticas están en permanente contacto con la bacteria y su rol en el ciclo epidemiológico es fundamental. Tanto en ovinos como en equinos la seroprevalencia intrapredial del serogrupo Sejroe se la encontró asociada a la de los bovinos, lo que implica una constante transmisión inter especie. Esto tiene implicancias no solo a nivel productivo, sino que desde el punto de vista de salud pública debe tenerse en cuenta, ya que estos animales conviven diariamente con las personas.

Este trabajo no solo determinó el impacto que tiene la leptospirosis a nivel reproductivo, en donde es fundamental tenerla en cuenta y aplicar correctas medidas de prevención y control para mejorar los índices reproductivos. Sino que también pone en discusión la importancia que se le da desde el punto de

vista de “Una Salud”. Se encontraron altos niveles de excreción en bovinos, una gran variabilidad de cepas circulantes, que hace más factibles infecciones a humanos con cepas incidentales en las que se desconoce su patogenicidad, y una alta proporción de animales domésticos infectados. Es necesario un mayor nivel de concientización en el ámbito ganadero, e implementación de medidas de control de esta enfermedad, no solo para los bovinos sino desde un punto de vista global.

## **ANEXO I**

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.

#### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.

#### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.

### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.

### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.

### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.

### ATENCIÓN

Esta sección pertenece a una publicación bajo suscripción y no contamos con los derechos para su reproducción.  
Para acceder al contenido completo consultar la fuente original.