

Informe final publicable de proyecto

Leptospirosis bovina: evaluación de pérdidas reproductivas y medidas de control aplicadas en establecimientos ganaderos del Uruguay

Código de proyecto ANII: FSA_1_2018_1_152685

Fecha de cierre de proyecto: 03/04/2024

PIAGGIO MAZZARA, José Miguel (Responsable Técnico - Científico)
SUANES MARTINEZ, Alejandra (Co-Responsable Técnico-Científico)
ANTUNES GASTAL, Gustavo Desire (Investigador)
BURONI, Florencia (Investigador)
BUSCHIAZZO, Alejandro (Investigador)
CALLERO CASSOU, JOSE LUIS (Investigador)
CAVESTANY BÖCKING, Daniel (Investigador)
FRAGA COTELO, Martín (Investigador)
GIANNEECHINI FONTANS, Ruben Edgardo (Investigador)
HAMOND, Camila (Investigador)
LÓPEZ, Fabiana (Investigador)
MACCHI VAZQUEZ, María Valentina (Investigador)
MARQUES BOABAID, Fabiana (Investigador)
NÚÑEZ ALESANDRE, Alvaro Jorge (Investigador)
NÚÑEZ ALESANDRE, Alvaro Jorge (Investigador)
PICASSO RISSO, Catalina (Investigador)
RIET CORREA, Franklin (Investigador)
RIVERO GARCIA, Rodolfo Carlos (Investigador)
RODRÍGUEZ OVIEDO, Victor Santiago (Investigador)

SALABERRY, Ximena (Investigador)

SCHNEIDER OLIVEIRA, Luiz Gustavo (Investigador)

ZARANTONELLI, Leticia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO. UNIDAD MIXTA PASTEUR+ INIA \\
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\
MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE TACUAREMBÓ \\
FACULTAD DE VETERINARIA. FUNDACIÓN MARCO PODESTÁ

Resumen del proyecto

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por el género *Leptospira* spp.. Es considerada una zoonosis de distribución mundial. La transmisión puede darse de forma directa por contacto con orina, o de forma indirecta en el medio ambiente contaminado. Los animales portadores asintomáticos perpetúan la enfermedad en los rodeos. El objetivo fue estudiar la leptospirosis bovina como causante de pérdidas reproductivas. Se estudiaron 31 predios con altos y bajos índices reproductivos sin antecedentes de vacunación contra Leptospirosis. Se realizó un estudio a nivel animal para determinar la asociación de seropositividad, excreción de leptospirosis patógenas entre animales infértiles y/o abortados y animales sanos. En cada animal se realizó PCR en tiempo real, aislamiento bacteriano y prueba de aglutinación microscópica. Los animales se siguieron durante la preñez y en cada tercio se retiraron muestras de sangre y orina. Se realizó un muestreo ambiental y de otras especies de animales domésticos los cuales podrían estar involucradas en el ciclo epidemiológico de la enfermedad y el relevamiento de las medidas de control en cada predio. Se realizó un modelo de regresión logística de efectos mixtos para evaluar asociación de variables independientes con ocurrencia de abortos, encontrándose una asociación a serogrupo Pomona. Así mismo, la seropositividad al serogrupo Sejroe y las copias de leptospirosis por mL de orina (q-PCR), mostraron asociaciones con las vacas infértiles. Los resultados de seropositividad de otros animales domésticos fueron: en ovinos fue de 80.08 % (579), en equinos, 98.52 % (200) y caninos 84.95 % (79). Se aislaron 51 *Leptospiras* patógenas distribuidas en 5 especies diferentes: Este estudio sugiere una posible asociación entre la leptospirosis, la infertilidad y el aborto en el ganado vacuno de carne uruguayo. Además, se determinó la importancia tanto de los diagnósticos serológicos como moleculares para evaluar la salud reproductiva de los rodeos.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Epidemiología

Palabras clave: Leptospirosis / pérdidas reproductivas / control /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos patógenos del género *Leptospira* spp.. Es considerada una zoonosis de distribución mundial (Alder y col., 2011). La transmisión puede darse de forma directa por contacto con orina de animales infectados, o de forma indirecta mediante el contacto con el medio ambiente contaminado, teniendo un rol fundamental los animales portadores asintomáticos en la diseminación de la enfermedad (Adler, 2015).

Se han descrito más de 300 serovares patógenas, que han sido agrupados en 25 serogrupos (Picardeau, 2013) y más de 60 especies (Vicent y col 2019). Existen 2 sistemas de clasificación, uno basado en las similitudes y diferencias antigénicas, y otro basado en las similitudes genéticas. Los dos sistemas de clasificación no siempre coinciden. A los efectos prácticos también se continúa usando la clasificación fenotípica. La misma tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que existe una relación estrecha entre algunas especies animales y serovares, los cuales son considerados de mantenimiento o adaptados al huésped y otras incidentales o no adaptados al huésped. Esta característica determina una condición de portadores de la enfermedad en los huéspedes de mantenimiento, perpetuando la enfermedad en la población (Faine y col., 1999).

La leptospirosis en los animales puede cursar de forma subclínica, aguda o crónica, dándose con mayor frecuencia la primera. Esto suele estar influenciado no solo por la dosis infectiva, sino por la serovar actuante, estado fisiológico e inmunitario del animal (Ellis, 2015). En aquellos casos en que la serovar está

adaptada al huésped, la infección suele cursar de forma subclínica, o puede ocurrir el desarrollo de la forma crónica. Esta última, es la que causa mayores preocupaciones en los predios ganaderos por el impacto económico que conlleva, dado que se caracteriza por la ocurrencia de abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y nacimiento de terneros débiles o prematuros (Adler y col., 2010).

La serovar de mantenimiento para el caso de los bovinos es la Hardjo. Existen 2 biotipos: hardjobovis y tipo hardjoprajitno, las cuales pertenecen a especies diferentes (Adler, 2015). El patrón de la infección en un rodeo por la serovar Hardjo varía con las condiciones de cría y el biotipo de Hardjo presente. En algunos países se asocian con infertilidad (Dhaliwal y col., 1996). Sin embargo, nuevas pruebas sugieren que la situación está cambiando (Sanhueza y col., 2013), siendo reconocida la leptospirosis como una de las principales causantes de fallas reproductivas en todo el mundo (Grooms y Bolin, 2005). En un estudio llevado a cabo en Irlanda se observó que la exposición a *Leptospira interrogans* serovar Hardjo estaba asociada a afecciones en la performance reproductiva (O'Doherty et al., 2015). Otros estiman que la ocurrencia de aborto en rodeos de carne es de entre 3 a 10% (Givens, 2006). Además de la ocurrencia de aborto, el serogrupo Hardjo también se lo relaciona con un aumento en el número de servicios previo a la concepción, aumento de intervalo interparto, retraso en el retorno al estro y fallas al parto (Grooms y Bolin, 2005).

Por otro lado, en aquellos predios en los que los animales están infectados con serovares no adaptadas al huésped, estos pueden llevar al desarrollo de la forma aguda de la enfermedad, que también radica en pérdidas productivas para los predios al causar afecciones reproductivas y en el crecimiento de los animales, en algunos casos puede resultar fatal (Alder, 2015). La ineficiencia reproductiva puede estar dada por múltiples factores, que pueden ir desde simples errores de manejo a complejas enfermedades multifactoriales (Grooms y Bolin, 2005). En general, estas pérdidas productivas son difíciles de cuantificar, más aún en los predios donde los bovinos no desarrollan signos clínicos visibles, ya que se debe tener en cuenta no solo los factores intrínsecos del animal, sino que también los factores de manejo. Para estimar estas pérdidas, buenos indicadores podrían ser los índices reproductivos, como los porcentajes de preñez, parición y destete.

A pesar que en rodeos lecheros las pérdidas fetales a causa de la leptospirosis se han descrito (Muñoz-Zanzi y col., 2004; Guitián y col., 1999), en rodeos de carne aun es necesario continuar investigando. En dos estudios en bovinos de carne no se observaron diferencias significativas en las pérdidas fetales tempranas en vacas infectadas vs. no infectadas (Genovez y col., 2001; Fava y col., 2004). De forma similar, en un estudio realizado en 656 predios ganaderos en Nueva Zelanda tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de preñes entre vacas seropositivas y seronegativas (Heuer, 2007). Por el contrario, en un estudio realizado en Estados Unidos se reportó que vacas seropositivas a *Leptospira* spp. tenían mayores pérdidas fetales a los 70 días post inseminación artificial que aquellas seronegativas (Kashimanickam y col., 2007). Elder et al. (1985) investigaron muestras de suero de 1371 vacas abortadas y 7254 no abortadas en Queensland, Australia, encontraron que el ganado de carne con un título de Pomona de al menos 3000 tenía una probabilidad del 26% (IC del 95%: 19-34) de abortar, y aquellos con infección por serovar Hardjo al mismo punto de corte tuvieron un 15% (95% CI 10-22) probabilidad de abortar. Sanhueza y col. (2013) estimaron que el 4,7% y 3,6% de las pérdidas fetales eran debidas a Hardjo y Pomona respectivamente, siendo mayor el riesgo de aborto para aquellas vacas sin antecedentes de vacunación que tuvieran títulos para el MAT mayores a 1:384 y 1:768 para dichos serogrupos.

Los factores de riesgo para la leptospirosis se dividen básicamente en tres: factores de riesgo intrínsecos del animal (serovares adaptados vs. incidentales), factores del medio ambiente (supervivencia del microorganismo, temperatura y humedad) y factores de manejo (compra de animales infectados, uso de toros infectados, acceso a alimento o agua contaminados, densidad animal) (Namita y col., 2008). Los principales factores de riesgo que se han identificado con la infección por *Leptospira* spp. en el ganado son rodeos abiertos, co-pastoreo con ovejas, el libre acceso a cursos de agua contaminados, el uso de monta natural (Laven, 2012; Ryan y col., 2012; Oliveira y col., 2010), el tamaño de rodeo (Laven, 2012; Ryan y col.,

2012; Oliveira y col., 2010), la densidad animal (Miyama y col., 2018) y la presencia de roedores en los lugares de almacenamiento del alimento (Favero y col., 2017). Hay una gran discrepancia entre autores en cuanto a la determinación de otros animales dentro del predio como potenciales factores de riesgo (Castro y col., 2009; Oliveira y col., 2010; Hashimoto y col., 2012; Silva y col., 2012), debe destacarse que estos factores dependen mucho de la región de estudio y del manejo implementado en cada predio, siendo importante estudiar dichos factores en las condiciones productivas de cada país o región.

El control de esta enfermedad se basa en la interrupción de la transmisión, ya sea vía directa o indirecta. Las medidas a tomar se aplican de acuerdo a la accesibilidad que se tenga de esos animales, la cantidad de estos y de la viabilidad económica. Para implementarlas, se debe tener en cuenta el área geográfica, la especie animal, la serovar predominante y su huésped de mantenimiento, las formas de transmisión y los factores de riesgo presentes en el predio (Alder, 2015). Las medidas de control suelen estar dirigidas a la vacunación, tratamiento con antibiótico y medidas de bioseguridad (Scicluna y col., 2011). Numerosos estudios se han realizado respecto a la eficacia de vacunas, no habiendo un consenso al respecto. Se ha demostrado que las vacunas son muy efectivas para prevenir la enfermedad, fundamentalmente cuando se las administra a las vaquillonas preservicio (Pereira y col., 2013), pero una vez que el bovino ya está infectado no previene la eliminación de la bacteria por la orina (Laven, 2012).

Se ha descrito que la temperatura y humedad son dos factores claves en el desarrollo de la enfermedad, es por eso que en países tropicales y subtropicales tienden a tener mayores prevalencias (Ellis, 1985). Uruguay es considerado un país subtropical en los que la *Leptospira* es prevalente y hace más de 40 años que se investiga su presencia en bovinos. El primer estudio serológico en bovinos data de 1965 en donde Caffarena y col. (1965) reportaron una seroprevalencia de 20%. Posteriormente, Caffarena y col. (1971), en una investigación serológica en diferentes especies, hallan un 24,4 % de seroprevalencia en bovinos de carne y un 64,11 % en bovinos de leche. En el año 1998 el Dr. Gil y colaboradores realizaron un monitoreo piloto en Salud Animal donde reportan una seroprevalencia de 14%, mientras que Repiso y col. (2002), en un estudio vinculado a enfermedades de la reproducción que afecta el ganado de carne, obtuvieron una seroprevalencia para leptospirosis de 38,5 % a nivel individual y de 71,2 % a nivel predial con títulos mayor e igual a 1:200, predominando los serovares Hardjo y Wolffi. La Dra. Easton (2006), en un estudio sobre las principales causas infecciosas de abortos en bovinos, describieron que, de 431 fetos estudiados, en 99 fueron detectados anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira* spp. en líquido fetal, en suero materno o en ambos. En el año 2015 se realizó una nueva determinación de seroprevalencia de Leptospirosis en ganado de carne. El proyecto liderado por el Dr. Fernández, de la Dirección General de Servicios Ganaderos, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) reporta una seroprevalencia a nivel de rodeo del 23,5 % y una prevalencia a nivel de establecimientos de 70%. Las serovares que predominaron desde el punto de vista serológico fueron Hardjo y Pomona.

La Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) cuenta con un servicio de leptospirosis. La técnica utilizada es la prueba de aglutinación microscópica (MAT), prueba de referencia para la OMSA (Organización Mundial de Salud Animal). En Uruguay se estableció para bovinos un título de corte de 1:200. Las serovares con mayor presencia en el país desde el punto de vista serológico en la población bovina son: Hardjo (con sus 2 biotipos) y Pomona. Existen variaciones entre los años, lo cual puede explicarse por la influencia climática y estacional de la enfermedad (Suanes, 2013). En un estudio reciente se lograron 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* 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, lo que es importante tener en cuenta no solo por la diseminación de la enfermedad en los rodeos, sino que también por la importancia a nivel de salud pública

que tiene (Zarantonelli y col., 2018). Es sabido que 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. De todas formas, es fundamental determinar en qué medida la *Leptospira* influye en la performance productiva y reproductiva del país, y lograr identificar las medidas de control más eficiente en estas condiciones productivas.

Uruguay es una de los principales países exportadores de carne vacuna a nivel mundial, siendo la ganadería uno de los rubros más importantes que tiene el país, generando ingresos de hasta US\$ 1.517 millones al año (Informe de comercio exterior, 2017). Los sistemas productivos suelen ser extensivos o semi-intensivos habiendo una dotación promedio de 0,73 vacunos/ha (informe de la Dirección de estadísticas agropecuaria del MGAP, 2018). Si bien los porcentajes de preñez suelen mantenerse estables en los predios ganaderos de un año a otro, se ha observado una amplitud de variación que va de un 30 a 97%. Como se observa estos porcentajes son muy variables entre los rodeos (INIA <http://www.inia.uy/inia-treinta-y-tres/XVI-Taller-de-evaluacion-de-los-diagnosticos-de-gestacion-vacuna->). La leptospirosis es una causa importante de pérdidas reproductivas, algunos estudios han reportado que explican más del 8% de estas pérdidas. (Fávero y col., 2017). En nuestro país este dato se desconoce, se conocen las serovares que circulan en nuestros rodeos, pero es necesario cuantificar las pérdidas reales a nivel productivo y reproductivo.

Objetivos:

1. Evaluación de las pérdidas reproductivas por exposición a *Leptospira* bovina
2. Estudiar la dinámica de enfermedad e infección en bovinos naturalmente infectados con *Leptospiras* patógenas.
3. Estudiar otras especies domésticas como posibles transmisores de la enfermedad
4. Validación de un protocolo de extracción de ADN para detectar *Leptospira* patógenas en muestras ambientales.
5. Relevamiento de principales medidas de manejo actuales para el control de la enfermedad.

Metodología/Diseño del estudio

1. Evaluación de las pérdidas reproductivas por exposición a *Leptospira* bovina.

Se trabajará sobre la base de un diseño de casos y controles. El marco geográfico serán establecimientos ganaderos dedicados a la cría distribuidos a lo largo de todo el territorio nacional. Se contactarán veterinarios de libre ejercicio, los cuales asisten a los establecimientos, con amplia experiencia en diagnóstico de gestación ya sea por tacto rectal o a partir de ecografías. Se cuenta con una lista de veterinarios con los cuales ya se tiene experiencia en trabajar juntos, los mismos son especialistas en reproducción y podrán aportar datos fidedignos de la situación particular de cada establecimiento. Se muestrearán 40 predios ganaderos los cuales se repartirán en 20 con bajos índices y 20 con altos índices reproductivos. Los puntos de corte para altos índices reproductivos son: predios con tasas de preñeces mayores al 88% y de bajos índices tasas de preñeces menores al 70 %. Se acompañará al veterinario de libre ejercicio a la realización del diagnóstico de preñez. Serán seleccionados 25 animales preñados y 10 animales no preñados, los mismos podrán ser de la categoría vaca o vaquillona de primera cría. Los animales seleccionados se les extraerá muestras de sangre sin anticoagulante y muestras de orina. Los 25 animales preñados serán seguidos durante su gestación, se realizarán 2 muestreos adicionales, el segundo muestreo se realizará durante el segundo tercio de gestación y el tercer muestreo se realizará posterior a la parición. En cada muestreo además de chequearse la preñez y/o nacimiento de ternero, se extraerán muestras de sangre y orina. Se definirá como caso un animal que comenzó preñado y se comprobó el aborto

durante la gestación. Los animales controles serán aquellos que en el último muestreo se constate un ternero al pie de la madre. Los muestreos serán coordinados por la red de veterinarios de la DILAVE y Facultad de Veterinaria, dichas instituciones cuentan con técnicos entrenados para realizar esta actividad. Una vez tomadas las muestras, serán transportadas al laboratorio de Leptospirosis del Departamento de Bacteriología de la DILAVE donde serán procesadas. Las muestras de sangre serán tomadas mediante veno-punción coccígea utilizando tubos de 5 ml con activador de coágulos. Se almacenarán a -20°C hasta su procesamiento. Para la extracción de la muestra de orina se realizará la limpieza completa de órganos genitales (limpiando con 70% de etanol) y masaje genital. Aproximadamente 60 ml de orina (segundo chorro) se recogerá en recipientes estériles de 120 ml. Se inocularán muestras de orina (100 μL) en el campo, inmediatamente o dentro de las 2 h de la recolección de la muestra, en 5 ml Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medio preparado con *Leptospira* Medium Base EMJH y albúmina BovoLep, suplementado con 100 mg / ml de 5-fluorouracilo y transportado a 4°C al laboratorio junto con las correspondientes muestras de sangre. En el laboratorio, se harán dos diluciones en serie 1:50 a partir del primer tubo inoculado con orina, en 5 ml Medio EMJH suplementado con 5-FU, y las tres diluciones serán incubadas a 29°C por 6 meses. Los tubos inoculados serán visualizados al microscopio de campo oscuro (MCO) semanalmente. El volumen restante de muestras de orina se conservará a 4°C para realizar qPCR-lipL32. La realización de la qPCR del gen lipL32 para la detección de ADN de cepas patógenas del género *Leptospira* se podrá realizar a partir de muestras biológicas (orina) y/ o cultivos de *Leptospira* spp. Para la realización de este test se tendrá en cuenta: Preparación de soluciones stock y de uso: oligonucleótidos y gBlocks, preparación de la mix de qPCR, preparación de la curva estándar agregado de controles. La amplificación por PCR de lipL32 se realizará utilizando ADN purificado de 10 ml de muestras de orina bovina. El ADN total se extraerá con el MiniKit de ADN genómico PureLink (Invitrogen). Para la amplificación por PCR se utilizará los cebadores oligonucleotídicos LipL32-188F (5' -TAAAGCCAGGACAAGCGCC-3') y LipL32-270R (5' - TACGAACTCCCATTTTCAGCG -3'). Para la tipificación de aislamientos se usarán: métodos serológicos a partir de antisueros de conejo específicos de serogrupo (KIT Royal Tropical Institute), los aislamientos serán enfrentados a 24 sueros para determinar el serogrupo. A nivel molecular se utilizarán técnicas de VNTR (Multilocus variable-number tandem repeat) y secuenciación parcial de diferentes genes para la confirmación de dichos serogrupos y acercarse a nivel de serovares. Los genes secuenciados serán: rrs16S gene y secY gene.

Los sueros serán procesados mediante la técnica de MAT en el laboratorio de DILAVE. Como antígenos se usarán cultivos vivos de 7 cepas de referencia, provenientes del Centro de Referencia de Leptospirosis "Instituto Osvaldo Cruz" de Río de Janeiro. Las cuales incluyen los siguientes serovares: Pomona, Hardjoprajitno, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Bratislava y Tarassovi. Así mismo se utilizarán 8 aislamientos de *Leptospiras* autóctonas: Kennewicki, Hardjo-bovis, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Canicola y dos *L. noguchii* aún sin determinación de serogrupo. El proceso se llevará a cabo en dos partes: una primera etapa cualitativa y una segunda etapa de titulación final. Para la titulación inicial se mezclarán por partes iguales una dilución 1/50 del suero en estudio con una suspensión de leptospiras vivas y, luego de una incubación a 29°C durante dos horas, se observará si existe aglutinación mediante lectura en el MCO, con una titulación final en esta primera etapa de 50. Para cada reacción se utilizará un control negativo o testigo, formado por una dilución de $\frac{1}{2}$ del serovar correspondiente y suero fisiológico tamponado pH 7,6. Luego se procederá a la titulación de anticuerpos contra el/los antígeno/s que dieron reacción positiva de aglutinación (50 % de leptospiras libres con respecto a una suspensión de antígeno usada como testigo). Para la titulación final, se repetirá la reacción de aglutinación con el antígeno que dio positivo y se lo enfrentará a diluciones sucesivas al $\frac{1}{2}$ a partir de la primera dilución 1/50 del suero problema. Se definirá el título final de aglutinación como la inversa de la mayor dilución de suero capaz de aglutinar 50 % o más de las leptospiras presentes en el campo microscópico. La muestra de suero a analizar se considerará reactiva cuando reacciona al menos con uno de los serovares utilizados como

antígeno y con título de corte 1/100.

2. Estudiar la dinámica de enfermedad e infección en bovinos naturalmente infectados con *Leptospiras* patógenas. En los establecimientos seleccionados los cuales se encuentren infectados se realizará un estudio longitudinal, donde se extraerán muestras de sangre y orina. Se estudiará la evolución de anticuerpos a partir de la prueba de MAT, momento de aparición de títulos, título de corte serológico, serovares reaccionantes, así mismo se realizará real time PCR en las muestras de orina, donde se procederá a estudiar la dinámica de excreción de leptospiras patógenas en animales naturalmente infectados. Los protocolos utilizados para el procesamiento de las muestras son iguales que para el objetivo específico número 1.

3. Estudio de otras especies domésticas como posibles transmisores de la enfermedad:

En los establecimientos seleccionados se realizó un relevamiento de otras especies domésticas que fueran criadas en los predios y tuvieran contacto con los bovinos. Se llevó a cabo un muestreo serológico de dichas especies, que incluyó ovinos, suinos, caninos y equinos. La técnica serológica utilizada fue la MAT, con un punto de corte variado según la especie en estudio: 1/50 para ovinos y suinos, y 1/100 para caninos y equinos, considerando reactivas las muestras a partir de estos valores. Las muestras fueron chequeadas con los 24 serogrupos de referencia y 8 aislamientos autóctonos. El protocolo utilizado para el procesamiento de las muestras de sangre fue similar al objetivo específico número 1, cambiando el punto de corte según la especie.

4. Validación de un protocolo de extracción de ADN para detectar *Leptospira* patógenas en muestras ambientales.

Se reconoció la importancia de la validación de un protocolo ambiental debido a la infección por exposición indirecta mediada por el medio ambiente a leptospiras patógenas a través de ambientes contaminados. La capacidad de las leptospiras patógenas para persistir en el ambiente acuoso se consideró un factor clave en la transmisión a nuevos hospederos. Por lo tanto, como parte del ciclo epidemiológico, se consideró fundamental conocer las leptospiras patógenas en muestras ambientales complejas. Se recolectaron muestras de suelo y agua recuperadas de sitios sospechosos de infección ambiental. Las muestras fueron procesadas por dos métodos directos: cultivo y detección de lipL32 por qPCR.

5. Relevamiento de principales medidas de manejo actuales para el control de la enfermedad:

Se diseñó un protocolo de encuesta que se realizó en el predio al veterinario y/o productor del establecimiento. Se recabaron datos acerca del control de enfermedades reproductivas, con énfasis en la Leptospirosis. Para el diseño se tuvieron en cuenta aspectos de manejo, tratamiento y profilaxis. Se recolectaron datos sobre la cría de animales y su manejo: rodeo abierto/cerrado, co-pastoreo con otras especies domésticas, uso de potreros de animales enfermos, origen de comida y agua, control de roedores en almacenamiento de alimento. También se solicitaron datos sobre vacunación, incluyendo tipo, cuáles y cuántas serovares están presentes en la vacuna usada, frecuencia de vacunación, comienzo de vacunación en la vida productiva de animales, mantenimiento de marca comercial o cambio, frecuencia de vacunación anual, etc. Además, se indagó sobre el uso de antibióticos en el caso de un brote: nombre, dosis, frecuencia de uso.

Resultados, análisis y discusión

Se muestrearon 31 predios ganaderos. En cada predio se realizaron 3 muestreos denominados: T1, T2 y T3 en cada muestreo el animal preñado previamente seleccionado fue muestreado 3 veces (T1, T2 y T3). En total se muestrearon 2395 bovinos hembras. La distribución por muestreo fue: T1: 1081, T2: 617 y T3: 697 animales respectivamente. Durante el seguimiento de vacas preñadas abortaron 35 animales. No se pudo asociar todos los serogrupos de Leptospirosis en vacas abarataadas. Se realizó además determinación de

títulos de Diarrea Viral bovina (DVB) siendo 58.7 % (635) y Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) 71.42 % (772) en el primer muestreo serológico. Para *Neospora caninum* se hizo a todas las vacas abortadas más dos controles por cada una de los animales abortados, siendo el 16.19 % (17) seropositivas. Se realizó el modelo de regresión logística de efectos mixtos, con variable predio como efecto aleatorio, para evaluar asociación de variables independientes con ocurrencia de abortos en vacas de carne en Uruguay, encontrándose una asociación a serogrupo Pomona con un OR de 8,0 con un IC95% (1,55 - 41,86) $p= 0,01$ y una asociación a *Nesopora caninum* con un OR de 11,31 con un IC95% (3,00 - 42,64) $p< 0.01$. 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 el OR de 5.29 a 8.06 , por lo que se decidió mantenerla en el modelo final. El serogrupo Pomona se lo vio asociado a la ocurrencia de abortos en vacas de carne. Esto coincide con lo reportado por otros autores, que, si bien asocian 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.

Para evaluar la asociación con animales infértiles se recolectaron muestras de 303 vacas infértiles y 778 vacas preñadas de 31 predios de carne. Mientras que un predio practicaba exclusivamente la reproducción artificial, los demás empleaban una combinación de métodos de reproducción artificial y monta natural. En el análisis univariado, la seropositividad al serogrupo Sejroe , las copias de leptospiras por mL de orina (q-PCR), y la seropositividad a IBR mostraron asociaciones estadísticamente significativas con las vacas infértiles. El OR para la variable Sejroe fue de 1.38 con un IC95% (1.05–1.82) $p=0.02$. Las copias de *Leptospira* /ml por qPCR dieron 10–100 copias un OR de 1.49 con un IC95% (1.11–2.01) $p<0.01$ y > 100 copias un OR de 2.76 con un IC95% (1.49–5.10) $p<0.01$. En un análisis descriptivo, se evaluaron diferentes valores de corte para la prueba de MAT para el serogrupo Sejroe. A medida que los valores de corte aumentaban, las diferencias entre las vacas preñadas e infértiles se hacían más pronunciadas, con disparidades notables observadas hasta el valor de corte de 1:1600 (figura 1). Sin embargo, más allá de este punto, estas diferencias ya no son evidentes. La baja prevalencia de animales reactivos a las otras cepas locales podría sugerir que los bovinos son mínimamente afectados por estas infecciones, experimentando cursos asintomáticos a pesar de la circulación previamente descrita de estas cepas en el país (Suanes et al., 2024). Aunque tanto el diagnóstico serológico como la excreción de *Leptospira* en orina se integraron con éxito en el modelo multivariado, no se encontró interacción entre estas variables. Esta ausencia de interacción podría deberse al patrón intermitente de excreción de orina, ya que investigaciones previas no han mostrado correlación entre la serología positiva de leptospirosis y la detección del patógeno en la orina (Otake et al., 2012). Un estudio en múltiples especies de animales domésticos en Brasil, que involucró a 512 animales, no reveló una correlación aparente entre resultados positivos de PCR en muestras de orina y títulos de anticuerpos en el MAT. Estos hallazgos indicaron que la seroreactividad no estaba significativamente asociada con los resultados de PCR, al considerar la seroreactividad general y cuando los sueros se categorizaban por títulos (Hammond et al., 2014). Además, es importante destacar que el ganado puede no producir una reacción contra sus propios aislamientos (Libonati et al., 2017), lo que resalta la falta de correlación entre la serología y la excreción.

La dinámica de títulos y de excreción determinó que la prueba de MAT dio, en T1 el 68.18% (737), en T2 el 65.8% (406) y T3 58.8% (410) de los animales seropositivos respectivamente en cada muestreo. En la prueba

de PCR, la cual mide la excreción de *Leptospiras* patógenas en la orina, en animales en T1 fue de 40.79 %, T2 ,23.82% y T3 ,41.60 %. El 31 % de los animales excretadores se detectaron en solo uno de los muestreos, el 21.3% en 2 de los muestreos y en el 3 % en los 3 muestreos realizados, este resultado demuestra la intermitencia en la excreción de *Leptospiras* en animales infectados. El 42.6 % de las vacas excretoras detectadas por la prueba de PCR fue seropositiva a Sejroe mientras que el 20 % a Pomona. Se aislaron 51 cepas de *Leptospira*, las cuales se distribuyen en: *L. borgpetersenii* (2), *L. Interrogans* (6), *L.noguchii* (21), *L. Santarosai* (9), No determinadas (13).

Respecto a la serología en otras especies domésticas, no bovinas, se procesaron un total de 1021 muestras por MAT, de las cuales 859 dieron positivas. La seropositividad en ovinos fue de 80.08 % (579), en equinos, 98.52 % (200), caninos 84.95 %(79), suinos 100% (1) y caprinos 100%(1).

Se validó un protocolo experimental de extracción de ADN en muestras de agua. Se colectaron muestras de agua de cada predio. Se validó un protocolo de extracción, para lo cual se agregó a los 40 mL de agua previos a la extracción 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 µl de cultivo puro de leptospiras (2×10^8). Se realizó la extracción, con control de la misma agua adicional (positivo) y se hace PCR (Syber). El agua es extraída de predio para incluir el efecto de la contaminación. Las muestras fueron corridas por duplicado. En los predios muestreados se encontraron 2 muestras de agua positivas de un total de 40 muestras extraídas de los predios muestreados.

Se analizaron de forma descriptiva los cuestionarios de recolección de datos en los 31 predios muestreados. Se resumen la información recolectada: El 38.71% de los rodeos eran abiertos, 83.87% co-pastoreo con ovinos, el 3.23% co-pastoreo con porcinos, 37.74% co-pastoreo con equinos. El 74.19% suplementaban a sus animales: 6.45% suplementan con silo, 35.48% suplementan con fardo y el 22.58% suplementan con ración. Las fuentes de agua se distribuían: uso de bebedero (51.6%), tajarar (67.7%), arroyo (54.8%), río (6.4%). Todos los predios hacían tanto inseminación artificial como natural, menos un predio que hacía solo artificial. El 67.74% contaba con potrero para animales enfermos. El 35.48% realizaba control de roedores. El 16% tenía antecedente de alguna enfermedad reproductiva en el predio. El 6.45% tenía antecedentes de *Leptospira*. Un predio estaba vacunado contra leptospirosis, tres años antes de comenzar los muestreos. El 25.81% habían observado infertilidad el año anterior, 54.84% había observado abortos el año anterior, 38.71% observaron nacimiento de terneros débiles o muertos el año anterior. El 9.6% de los predios observó alguna vez vacas adultas con fiebre y anorexia. El 3.2% observó alguna vez ictericia en algún caso clínico. Ningún predio tenía antecedentes de animales adultos con fiebre o hemoglobinuria.

Conclusiones y recomendaciones

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 la ganadería uruguaya 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.

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, el aborto suele ocurrir de forma poco frecuente en los rebaños, pudiendo ocurrir de 6 a 12 semanas post infección. En cambio, si las infecciones son del tipo incidentales como ocurre con el serovar Pomona, el aborto ocurre más frecuentemente (en forma de tormenta de aborto) en los rebaños, y suele darse de 4 a 6 semanas post infección.

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 en Uruguay y con reportes de

Latinoamérica por otros autores (Suanes y col, 2024)

En este ensayo el serogrupo Pomona se lo vio asociado a la ocurrencia de abortos en vacas de carne. Sin embargo, la asociación del aborto con títulos altos no fue posible. 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.

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. Hardjo-bovis es reconocida por circular en los rodeos de forma endémica Uruguay, por lo que los abortos por este serovar son difíciles de observar (Zarantonelli y col, 2018). 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. Para encontrar esta asociación un mayor número de muestras debería ser incluido en el estudio.

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. La neosporosis en el Uruguay se considera que se encuentra de forma endémica en el rodeo, tanto en ganadería como en lechería, por lo que se esperaría que la ocurrencia de aborto se dé de forma esporádica mediante la transmisión del tipo endógena. 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 previamente en el periodo 2015-2018. No está claro el efecto que tiene estas cepas en bovinos, los bajo niveles de seropositividad podrían deberse bien a la baja circulación de estos serogrupos, 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. 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 imposible de estimar a priori. Otro tipo de estudios deberían realizarse para medir el impacto que tiene la Leptospirosis en esta afección reproductiva.

Este estudio además evaluó la posible correlación entre la leptospirosis y la infertilidad en el ganado vacuno de carne uruguayo. Un estudio de casos y controles involucró a los 31 predios muestreados. Los resultados demostraron una asociación entre la seropositividad al serogrupo Sejroe (valor de corte 1:200) y la infertilidad en el ganado (OR=1.31; valor de $p=0.06$). Además, el nivel de excreción de *Leptospira* (qPCR) en la orina estuvo asociado con un mayor riesgo de infertilidad, siendo las vacas que excretaba más de 100 copias por mL de orina las que tenían las mayores probabilidades de infertilidad (OR=2.34; valor de $p<0.01$). Este estudio sugiere una posible asociación entre la leptospirosis y la infertilidad en el ganado vacuno de carne uruguayo, enfatizando la importancia tanto de los diagnósticos serológicos como moleculares para evaluar la salud reproductiva en los hatos de ganado. La investigación futura debería explorar el impacto de los serogrupos de *Leptospira* en otros trastornos reproductivos en el ganado y el impacto de esta enfermedad en la salud pública.

Referencias bibliográficas

1. Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 140, 287-96, 2010
2. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. (2011) Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Veterinary microbiology*, 153 73-81.
3. Alder B. (2015) *Leptospira* and leptospirosis. 387. Melbourne, Springer, 293p.
4. Dhaliwal GS, Murray RD, Ellis WA. (1996) Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo relative to the year of diagnosis. *The Veterinary Record*, 138(12): 272.
5. Caffarena RM, Agorio M. (1965). Comprobaciones serológicas de Brucelosis, Fiebre "Q" y Leptospirosis en Bovinos del Uruguay. *Gaceta Veterinaria (Buenos Aires)*, 27 (182): 377 - 387.
6. Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. (1971). Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev. Urug. Pat. Clín. Microbiol.*, 9: 186-194.
7. Castro V, Azevedo SS, Gotti TB, Batista CSA, Gentili J, Morais ZM, Vasconcellos SA, Genovez ME. (2009) Fatores de risco para leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(6): 1438-1442.
8. DIEA y MGAP (2018) Anuario estadístico Agropecuario 2018. Disponible en: https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf. Fecha de consulta: 02/10/18.
9. Easton C. (2006) Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Identificación de la acción de agentes infecciosos vinculados con el aborto bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República, Uruguay, pp. 57.
10. Elder JK, Pepper PM, Hill MW, Ward WH. The significance of leptospiral titres associated with bovine abortion. *Australian veterinary journal* 62, 258-62, 1985
11. Ellis WA. (2015). Animal leptospirosis. In *Leptospira* and leptospirosis (pp. 99-137). Springer, Berlin, Heidelberg.
12. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (1999) *Leptospira* and leptospirosis. 2a ed. Melbourne, MediSci, 272 p.
13. Fava CD, Vasconcellos SA, D'Angelino JL, Morais ZM, Figueiredo LA, Razook AG, Cyrillo JNSG, Oliveira JV, Reichert RH. (2004) Reproductive rates and seropositivity for *Leptospira* spp. in a herd of beef cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Ars Veterinaria*, 20: 52-61.
14. Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, Stefani LM, Da Silva AS. (2017) Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial pathogenesis*, 107: 149-154.
15. Genovez ME, Oliveira JC, Castro V, Gregory L, Fava CD, Ferrari CIL, Pituco EM, Scarcelli E, Cardoso MV, Grasso LMPS, Santos SM. (2001) Desempenho reprodutivo de um rebanho Nelore de criação extensiva com leptospirose endêmica: Estudos preliminares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25: 244-246.
16. Givens MD. (2006) A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in cattle. *Theriogenology*, 66(3): 648-654.
17. Grooms DL, Bolin CA. (2005) Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21(2): 463-472.
18. Guitián J, Thurmond MC, Hietala SK. (1999) Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215: 515-518.
19. Hashimoto VY, Dias JA, Spohr KA, Silva MC, Andrade MG, Müller EE, Freitas JC. (2012) Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32: 99-105

20. Heuer C. (2007) Part 2: Association between the prevalence of contagious reproductive pathogens and beef cowfertility. Management of beef cattle for high fertility. Epicentre, Massey University, Palmerston North.
21. Kasimanickam R, Whittier WD, Collins JC, Currin JF, Inman B, Hall JB, Pelzer KD. (2007) A field study of the effects of a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain hardjobovis vaccine administered with oxytetracycline on reproductive performance in beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231: 1709-1714.
22. Laven R. (2012) Leptospirosis. *Livestock (Electronic)*, 17 (2): 31.
23. 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.
24. Muñoz-Zanzi CA, Thurmond MC, Hietala SK. (2004) Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology*, 61:1085-1099.
25. Namita, J, Joshi RK, Choudhary GK. (2008) Bovine leptospirosis: diagnosis and control. *North-East Veterinarian*, 8(3): 30-32.
26. Suanes, M.V. Macchi, F. Fernández, X. Salaberry, C. Moreira, A.D. Gil. Seroprevalence and herd-level associated factors of pathogenic *Leptospira* spp. circulating locally in dairy cattle in Uruguay *Prev. Vet. Med.*, 223 (2024), Article 106097
27. Zarantonelli, A. Suanes, P. Meny, F. Buroni, C. Nieves, X. Salaberry, et al. 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) (2018).

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)