

Informe final publicable de proyecto

Estudios de virulencia y patogenicidad de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp: definición de antígenos bacterianos para la formulación de vacunas de uso veterinaria

Código de proyecto ANII: FSA_1_2018_1_152689

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2023

ZARANTONELLI, Leticia (Responsable Técnico - Científico)

RIVERO GARCIA, Rodolfo Carlos (Investigador)

SALABERRY, Ximena (Investigador)

SCHNEIDER OLIVEIRA, Luiz Gustavo (Investigador)

SUANES MARTINEZ, Alejandra (Investigador)

BURONI, Florencia (Investigador)

BUSCHIAZZO, Alejandro (Investigador)

GIANNITTI, Federico (Investigador)

HAMOND, Camila (Investigador)

LÓPEZ, Fabiana (Investigador)

MACCHI VAZQUEZ, Marfa Valentina (Investigador)

MARQUES BOABAID, Fabiana (Investigador)

RIET CORREA, Franklin (Investigador)

BARRIOS INTHAMOUSSU, Mariana (Becario)

CIUFFO DUQUE, Camila (Becario)

BARRIOS INTHAMOUSSU, Mariana (Becario)

CIUFFO DUQUE, Camila (Becario)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO. UNIDAD MIXTA PASTEUR+ INIA (Institución Proponente) \\

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE TACUAREMBÓ \\

MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIVISIÓN DE LABORATORIOS VETERINARIOS "MIGUEL C RUBINO" \\

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

Resumen del proyecto

La leptospirosis, una de las zoonosis bacterianas emergentes de mayor distribución mundial, es causada por especies patógenas del género *Leptospira*. Estas bacterias infectan un amplio rango de hospederos, incluyendo animales de vida libre, domésticos y al humano. Los animales crónicamente infectados eliminan la bacteria en la orina, contaminando el ambiente y perpetuando el ciclo de infección. En humanos la leptospirosis puede causar una enfermedad severa y mortal, mientras que en animales de producción tiene un importante impacto económico negativo. La infección aguda puede causar muerte en terneros, inducir abortos en vacas preñadas o provocar el nacimiento de crías débiles; la infección crónica de vacas adultas también está asociada a una disminución de la eficiencia reproductiva del rebaño. El uso de vacunas formuladas con bacterias inactivadas es una de las herramientas eficaces para el control de leptospirosis. Debido a la alta variabilidad antigénica en las leptospiras patógenas, para lograr una máxima eficacia las vacunas deben incluir las variedades de leptospiras que circulan y causan enfermedad en una determinada región. En un trabajo interinstitucional previo identificamos qué especies y serogrupos de *Leptospira* infectan a los rodeos de bovinos en Uruguay, encontrando que no todas están representadas en las formulaciones de las vacunas actualmente disponibles para uso veterinario. En este proyecto estudiamos aspectos relacionados con la virulencia y capacidad infectiva e inmunogénica de estas variantes autóctonas de *Leptospira* en un modelo murino de infección experimental y también en un modelo de infección en bovinos. Los resultados obtenidos nos permiten definir variantes autóctonas de *Leptospira* spp. como potenciales antígenos bacterianos a incluir en nuevas formulaciones de vacunas anti-*Leptospira* de uso veterinario.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Enfermedades infecciosas con impacto en salud

Palabras clave: Leptospirosis / Interacción hospedero-patógeno / Vacunas /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana emergente de distribución mundial causada por las especies patógenas del género *Leptospira* (Bharti et al., 2003). Estas espiroquetas son patógenos muy exitosos capaces de infectar una enorme variedad de hospederos incluyendo peces, reptiles, y mamíferos (Ko et al., 2009). La enfermedad se presenta con un amplio rango de signos y síntomas clínicos que pueden ir desde un cuadro leve o sub-clínico hasta una infección con falla multi-orgánica que puede ocasionar la muerte del individuo afectado. Recientemente una revisión sistemática de casos de leptospirosis humana a nivel mundial estimó que ocurren más de 1 millón de casos severos por año ocasionando más de 60000 muertes, por lo que esta zoonosis muestra tasas de morbi/mortalidad superiores al dengue severo o la leishmaniasis visceral (Costa et al., 2015). Las leptospiras son capaces de invadir a través de la piel dañada o de las mucosas, alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse hacia distintos órganos. En los hospederos de mantenimiento la bacteria coloniza y se reproduce en los túbulos renales, desde donde es luego eliminada hacia el medio ambiente a través de la orina. El ciclo de transmisión se completa cuando hospederos accidentales entran en contacto directo con la orina de animales infectados y/o con el suelo y agua contaminados (Picardeau, 2017). Es así que tanto los animales de vida libre como los domésticos que son portadores de *Leptospira* spp. constituyen un elemento esencial en la transmisión de la leptospirosis (McBride et al., 2005). En los animales de interés pecuario como bovinos, ovinos y suinos, es una enfermedad con impacto económico negativo (Adler, 2015). En bovinos, la infección con un cuadro clínico agudo ocurre en terneros, causando septicemia y alta mortalidad (Reis et al., 2017). En vacas adultas puede causar abortos,

nacimiento de crías débiles, mastitis y merma en la producción de leche. La infección crónica se asocia fuertemente a una disminución de la eficiencia reproductiva del rebaño y aumento del intervalo entre partos (Sullivan, 1970; Thiermann, 1982; Ellis et al., 1977; Momtaz et al., 2012).

En Uruguay la leptospirosis ha sido identificada como una de las enfermedades reproductivas re-emergentes que afecta tanto al ganado bovino de carne como de leche, con datos de seroprevalencia variables según el área geográfica en un rango de 25-60 % a nivel individual y de 50- 70% a nivel de establecimientos (Caffarena RM 1971, Repiso, Gil et al. 2005, Suanes 2013). Según el panel de antígenos utilizado para el diagnóstico, Sejroe y Pomona son los principales serogrupos involucrados. La leptospirosis es una de las causas infecciosas que se asocia a pérdidas fetales en ganado bovino de carne y leche. En un estudio realizado en predios ganaderos en Nueva Zelanda se estimó que 4.7% y 3.6 % de las pérdidas fetales de la población estudiada eran atribuibles a leptospirosis causada por los serogrupos Sejroe y Pomona, respectivamente (Sanhueza et al., 2013). En Uruguay, en un estudio basado en métodos de diagnóstico indirecto por histopatología de fetos y serología de las hembras que abortaron, un 25-30% de los abortos bovinos por causas infecciosas analizados en el laboratorio (DILAVE) fueron atribuidos a leptospirosis (Easton,2006).

Las leptospiras son bacterias sensibles a los antibióticos y la terapia antimicrobiana es recomendada para el control de brotes en terneros. La erradicación de esta zoonosis resulta imposible debido a la diversidad de especies de animales que sirven de reservorio de la bacteria por lo que la implementación de medidas de prevención y control sigue siendo muy desafiante (McBride et al., 2005). La vacunación es el método de prevención más ampliamente utilizado en animales domésticos y existen vacunas comerciales para bovinos, suinos y caninos (Ellis, 2015). Las vacunas anti leptospiras de uso veterinario están formuladas con bacterias enteras inactivadas (bacterinas) e incluyen una o más serovariedades de *Leptospira*. La inmunidad alcanzada mediante el uso de estas bacterinas está dirigida principalmente hacia el lipopolisacárido (LPS), principal antígeno de superficie cuya estructura es diferente en cada una de las más de 200 serovariedades que hoy se conocen en el género *Leptospira* (Adler, 2015). Esta amplia variabilidad antigénica (serovares) impone un desafío importante en la formulación de vacunas eficaces. Para proveer protección, dichas vacunas deben incluir serovares que se correspondan con las cepas que efectivamente circulan en una región geográfica determinada ya que está demostrado que la protección cruzada entre serovares diferentes es limitada (Tabata et al., 2002). El uso de este tipo de vacunas es eficiente en la protección de los animales ante una infección aguda y letal. Sin embargo, esta protección es limitada en el tiempo, requiere de dosis de refuerzo y su máxima eficacia se logra para los serovares infectivos estrechamente relacionados a aquellos presentes en la formulación de la vacuna (Suepaul et al., 2010). Es importante tener en cuenta que en animales en los cuales se dan infecciones asintomáticas con persistencia de la bacteria en el riñón, tal como sucede en el bovino, un adecuado programa de vacunación en el rebaño puede reducir la carga bacteriana que es eliminada en la orina, disminuyendo concomitantemente el riesgo de infección de animales más jóvenes y no expuestos previamente. Esto ha sido recientemente demostrado mediante una extensiva revisión bibliográfica y meta análisis por Sanhueza y colaboradores quienes muestran que la vacunación de bovinos contra el serovar Hardjo tiene una eficacia cercana al 90% en la prevención de la excreción urinaria de leptospiras (Sanhueza et al, 2018). Esta eficacia de las vacunas en prevenir la eliminación de leptospiras en la orina no solo es suficiente para reducir la incidencia de la infección en otros animales susceptibles sino que también reduce el riesgo de transmisión e infección a los humanos que trabajan en contacto directo con los animales (Adler et al., 2010).

Las tres formulaciones de vacunas comerciales contra la leptospirosis disponibles para la inmunización de bovinos en Uruguay son polivalentes: una contiene ocho serovares (Pomona, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjobovis*, *Hardjoprajitno*, *Canicola*, *Wolffi*, *Grippotyphosa* y *Tarassovi*); otra incluye once serovares (Pomona, *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Hardjobovis*, *Hardjo*, *Canicola*, *Wolffi*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi*, *Bataviae* y *Pyrogenes*); y la tercera está formulada con cinco serovares (*Canicola*, *Hardjo*,

Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona).

En un proyecto de investigación multicéntrico sobre leptospirosis bovina llevado a cabo el Grupo de Trabajo Interinstitucional en Leptospirosis (GTIL) que integramos investigadores del INIA, el Institut Pasteur de Montevideo, la UdelaR y el DILAVE se logró un gran avance en el estudio de esta zoonosis mediante el aislamiento y caracterización de más de 60 cepas autóctonas de especies patógenas de *Leptospira* de origen bovino. Se identificaron tres especies diferentes (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. noguchii*) y siete serovariedades distintas (Zarantonelli L., et al., 2018). Solamente las serovariedades Hardjo y Canicola están presentes en las vacunas comercialmente disponibles en Uruguay. La serovariedad Pomona Kennewicki (correspondiente a la especie *L. interrogans*) más frecuentemente aislada en bovinos también fue recientemente aislada en un caso de leptospirosis humana en un trabajador rural (Meny et al., 2017). Es pertinente remarcar que esta serovariedad Kennewicki no están incluida en ninguna de las formulaciones de bacterinas disponibles para uso en bovinos, así como tampoco ninguna de las serovariedades aisladas de la especie *L. noguchii*. No disponemos en Uruguay de una vacuna contra la leptospirosis bovina que incluya cepas autóctonas como antígenos incluidos en su formulación. Las diversas vacunas disponibles están formuladas con cepas que podrían ser antigénicamente distintas de las cepas de campo prevalentes, por lo tanto, podrían ser incapaces de promover una protección eficaz contra la enfermedad y/o la infección crónica, cuando los animales están expuestos a cepas locales (Dib et al., 2014).

Desde hace más de 100 años de su descubrimiento, la leptospirosis humana se asocia con la presencia de roedores, especialmente ratas y ratones (Inada et al., 1916). Ambas especies actúan como el principal reservorio de la bacteria en ambientes urbanos y sub-urbanos cumpliendo un rol central en la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, la infección y caracterización de la enfermedad en ambas especies en modelos experimentales de laboratorio es reciente (Thierman et al, 1981, Natarajaseenivasan, et al, 1997), muy probablemente debido a que estas especies son relativamente resistentes a la infección aguda y no han sido considerados como modelos bona fide que reproduzcan la enfermedad severa como suele ocurrir en el humano. Así, el modelo de infección experimental en hámster dorado se ha utilizado históricamente con el fin de reproducir la enfermedad aguda y severa, así como para definir la infectividad de una cepa y, recuperar atributos de virulencia en cepas atenuadas por sucesivos pasajes in vitro.

Sin embargo, resulta imprescindible profundizar en el conocimiento de la biología y fisiopatología de las distintas especies y serovariedades patógenas del género *Leptospira* en modelos experimentales de infección sub-letal y crónica con el fin de entender mejor cómo estas bacterias infectan y logran sobrevivir en especies de animales que son reservorios. El modelo murino resulta de gran interés para realizar este tipo de estudios debido a la gran versatilidad que permite en función de las diversas líneas de laboratorio disponibles, así como también de la disponibilidad y factibilidad de obtención de líneas transgénicas que permiten lograr un mejor entendimiento cuando se busca una comprensión profunda de cuáles son los mecanismos involucrados en la fisiopatogenia microbiana incluyendo la respuesta inmune al patógeno así como a posibles formulaciones de vacunas. Si bien existen varios estudios de virulencia y patogenia mediante infección experimental en diferentes líneas murinas que reproducen el curso de la infección (diseminación del agente, histopatología renal y la respuesta inmune al patógeno), la gran mayoría de estos trabajos están centrados en el estudio de un número limitado de serovares de la especie *L. interrogans* (Gomes-Solecki et al 2017). Debemos destacar además que, a excepción de un trabajo reciente que logra reproducir el ciclo de infección sub-letal de *L. interrogans* serovar Copenhageni mediante inoculación a través de la mucosa ocular (Sullivan et al 2017), el resto de los estudios de virulencia en modelos murinos utilizaron la vía de inoculación intraperitoneal. Esta última no es una vía de infección natural por leptospirosis patógenas y podría sobre-estimar el efecto y reacción de los mecanismos de respuesta del hospedero murino a la bacteria.

En este proyecto abordamos el estudio de aspectos relacionados con la virulencia y patogenicidad de tres

especies diferentes de *Leptospira* aislados de bovinos infectados en Uruguay, mediante el uso de dos modelos de infección experimental. Nos propusimos caracterizar la capacidad infectiva de estos aislados por una vía de infección natural por mucosas, su potencial de diseminación y de colonización renal en un modelo murino y en un modelo de infección bovinos. Nos interesó conocer particularmente en ambos modelos experimentales la capacidad inmunogénica de las especies y serovares estudiados.

Por último, y no menos importante, mediante la estandarización de ambos modelos de infección nos propusimos generar una valiosa herramienta disponible en nuestro medio para el estudio de virulencia y patogenicidad de diferentes especies y serovares patógenos de *Leptospira*. Destacamos que el modelo murino de infección experimental ha sido de especial interés y se ha utilizado en otro proyecto en curso que tienen como objetivo evaluar la respuesta protectora en bovinos inmunizados con una vacuna anti-*Leptospira* de amplio uso en el país (FSSA_1_2019_1_160195).

Entendemos que con los resultados logrados en el marco de este proyecto aportaremos conocimiento genuino relacionado a la interacción hospedero-*Leptospiras* patógenas logrando un mejor entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad zoonótica. Además, los resultados generados respecto a la caracterización de la virulencia e inmunogenicidad de variantes de *Leptospiras* patógenas que infectan a los rodeos uruguayos serán de suma utilidad para la definición de variantes antigénicas a incluir en nuevas formulaciones de vacunas de uso veterinario que, de manera acorde a la epidemiología local, apunten a actualizar/mejorar las medidas de control y prevención de la leptospirosis en Uruguay y en la región.

Metodología/Diseño del estudio

Estudiamos la virulencia y patogenicidad de aislamientos de *Leptospira* spp obtenidos de bovinos infectados de rodeos uruguayos. La estrategia experimental se basó en el uso de dos modelos de infección por *Leptospira* spp utilizando vías de inoculación que reproducen condiciones de infección natural, como es la penetración de leptospirosis patógenas a través de mucosas. Utilizamos un modelo de infección en la especie de animal de uso en laboratorio *Mus musculus* (modelo sub-letal en ratón adulto) y otro modelo de infección en terneras sanas.

Los protocolos de los ensayos que involucraron el uso de animales fueron examinados y aprobados por los Comité de Ética de Uso de Animales de las instituciones involucradas: Protocolo CEUA Pasteur #003/2020 y Protocolo CEUA INIA #2018.2b.

I- Condiciones de crecimiento y cultivo de *Leptospira* spp

Se estudiaron aislamientos de *Leptospira* spp crio-conservados en nitrógeno líquido. Una vez descongelados, se cultivaron a 30 °C en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). Los cultivos fueron monitoreados mediante observación en microscopio de campo oscuro (MCO). Para cada una de las variantes de leptospirosis a estudiar se realizó una curva de crecimiento con el objetivo de conocer tanto la velocidad de crecimiento como el máximo inóculo en fase exponencial de crecimiento alcanzable in vitro. El crecimiento bacteriano se cuantificó mediante recuento de bacterias viables, móviles en cámara de Petroff-Hausser y también mediante qPCR cuantitativa (amplificación del gen lipL32). Los datos experimentales de crecimiento in vitro se tomaron como insumo para la elaboración de los inóculos bacterianos a utilizar en los ensayos de infección in vivo en ambos modelos experimentales.

Para la preparación de los inóculos de infección se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento obtenidos de aislamientos crio-conservados que no tenían más de 10 pasajes in vitro. Se cuantificó el número de bacterias viables mediante recuento en cámara de Petroff-Hausser (Fisher) (Faine et al., 2000).

II- Evaluación de virulencia de diferentes serovariedades de especies patógenas de *Leptospira* aisladas de bovinos en el modelo murino de infección subletal-crónico.

Se utilizaron ratones hembra, de 8-10 semanas de edad de la línea consanguínea C57/BL6 criados en las

instalaciones del bioterio del Institut Pasteur de Montevideo. En un primer ensayo se estandarizaron condiciones de infección definiendo el volumen del inóculo bacteriano a utilizar, así como la vía de infección a través de mucosas. Un grupo de n=8 ratones fueron desafiados con 25 µL de inóculo conteniendo 1 x 10⁸ leptospiras *L. borgpetersenii* (sg. Sejroe sv. Hardjo) por vía intranasal, y n=7 ratones fueron desafiados con el mismo inóculo bacteriano pero por la vía intraperitoneal. Además, se incluyó un grupo control (n=3) inoculado por vía intranasal con 25 µL de PBS 1X pH 7.4. Se evaluaron cambios en el peso corporal, estado general de los animales y diseminación de la bacteria en sangre a las 24, 48 y 72 horas post infección mediante la determinación de la carga bacteriana (leptospiremia) por qPCR (amplificación del gen lipL32). Se detectó la presencia de leptospiras en sangre en los animales infectados por ambas vías, por lo que se definió la vía intranasal como vía de infección por mucosas a utilizar en los experimentos posteriores.

Para el estudio comparativo de la capacidad de infección y colonización renal en el modelo murino, se infectaron por vía intra-nasal, grupos de n=5-6 ratones con las siguientes variantes de *Leptospira* spp. aisladas de bovinos: *L. interrogans* sg. Pomona sv Kennewicki (LIP); *L. borgpetersenii* sg. Sejroe sv. Hardjo (LBS), *L. interrogans* sg. Canicola sv. Canicola (LIC), *L. noguchii* sg. Pyrogenes (LNP), *L. noguchii* sg. Australis (LNAus), *L. noguchii* sg. Autumnalis (LNA) y *L. noguchii* de sg. no determinado (LNND).

Se registró diariamente el peso de los animales, así como su estado general. Para evaluar la cinética de infección, diseminación y posterior colonización a nivel renal, se tomaron muestras de sangre, orina y de diferentes tejidos y órganos según se detalla en el esquema 1 (Anexo, Esquema 1).

Las muestras de sangre fueron colectadas mediante punción sub-mandibular y las muestras de orina se colectaron en cajas metabólicas alojando los animales individualmente durante cuatro horas con agua y comida ad libitum. Al momento del punto final (endpoint), se colectaron diferentes órganos para estudio. Un polo de cada riñón se conservó en formalina tamponada para estudios de histopatología e inmunohistoquímica. Parte de las diferentes muestras biológicas colectadas se inocularon en medio EMJH para cultivo microbiológico y otra parte se conservó a -80°C para extracción de ADN y de ARN mediante el uso de kits comerciales.

En los distintos grupos de animales infectados con los distintos aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp se estudió:

- La cinética de la infección cuantificando la carga bacteriana en sangre, orina y riñón. Mediante amplificación del gen lipL32 por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), determinamos el número de copias de genomas por uL de sangre y/u orina o por ug de riñón.
- La presencia de leptospiras viables en muestras de orina y riñón mediante cultivo microbiológico a 30°C en medio EMJH, con monitoreo semanal mediante observación en MCO durante 1 mes.
- La respuesta inflamatoria en pulmón (órgano blanco en la fase inmediata a la infección por mucosa intranasal) y riñón. Luego de la extracción del ARN de muestras de tejidos conservadas a -70 con un kit comercial (Qiagen), se realizó una transcripción reversa y a partir del ADN copia total se amplificaron y cuantificaron por RT-qPCR los transcritos de ARN mensajeros específicos para las citoquinas IL-1Beta, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-4 e IL-10, para las quimiocinas KC, RANTES, MIP-2 y para la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Sullivan et al 2017, Chassin et al 2009, Fantónd'Ándon et al 2014). iNOS se expresa en macrófagos y células endoteliales catalizando la producción de óxido nítrico, molécula de acción antimicrobiana que al ser secretada en el parénquima renal provoca nefritis y fibrosis renal como respuesta a la infección por *Leptospira* spp
- La presencia de daños tisulares en el riñón mediante estudios histopatología y la colonización de los túbulos renales corticales mediante inmunohistoquímica. A partir de muestras de tejidos embebidos en parafina, se realizaron cortes de 4-5 µm de espesor con micrótopo, se colorearon con hematoxilina y eosina y se examinaron en un microscopio óptico, equipado con una cámara digital. El examen histopatológico se realizó a ciegas en el laboratorio de patología de la Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela,

registrando cambios histológicos en el intersticio, túbulos y glomérulos renales. Cuando se evidenciaron lesiones histológicas se realizó una marcación por inmunohistoquímica para evidenciar co-localización intralesional/intratubular de leptospiras.

- La respuesta humoral a los 15 y 30 dpi mediante determinando títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* mediante MAT y ELISA (este último de desarrollo in house utilizando como antígeno un extracto bacteriano de células enteras obtenido por sonicación de bacterias en fase exponencial de crecimiento)

III- Evaluación de la capacidad infectiva a través de mucosas de cuatro serovariedades de especies patógenas de *Leptospira* aisladas de bovinos en un modelo de infección experimental en terneras de raza Bradford.

Se estudiaron en el modelo bovino las siguientes variantes de *Leptospiras*: *L. interrogans* sg. Pomona sv Kennewicki (LIP), *L. borgpetersenii* sg. Sejroe sv. Hardjo (LBS) (ser las variantes más frecuentemente aisladas de bovinos (Zarantonelli et al. 2018)), *L. noguchii* sg. Autumnalis (LNA) (serogrupo más frecuentemente aislado de la especie *noguchii*) y *L. interrogans* sg. Canicola sv. Canicola (LIC) (aislada de caso agudo de leptospirosis en bovinos y variante reportada como agente etiológico de leptospirosis en trabajadores rurales en Uruguay (Meny P. et al 2017)). Nos propusimos como objetivos (i) determinar la capacidad de infección a través de mucosas, (ii) estudiar el desarrollo de síntomas clínicos post-infección, (iii) caracterizar los hallazgos macroscópicos y microscópicos al punto final del experimento y (iv) evaluar la capacidad inmunogénica post-infección de las cuatro variantes de *Leptospira* estudiadas mediante determinación de títulos de anticuerpos aglutinantes por MAT.

Para la definición de las terneras a incluir en los grupos experimentales, se preseleccionaron 48 duplas madres/terneras de dos meses de edad y de raza Braford de un rodeo bovino (31° 42' 36.648" S 55° 49' 34.716" W) sin casuística de abortos en el año previo inmediato al estudio y sin histórico de vacunación. Se colectaron muestras de suero para determinar títulos de anticuerpos aglutinantes anti-*leptospira* por MAT contra un panel de antígenos representativo de 15 serogrupos, incluyendo cepas de referencia y todas las variantes de *Leptospira* autóctonas aisladas de bovinos en Uruguay, y usando como punto de corte 1:50, de manera de evidenciar exposición natural a la bacteria. Se colectaron muestras de orina para la detección de ADN leptospiras patógenas mediante amplificación del gen *lipL32* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con un límite de detección de 10 genomas copia de *Leptospira* spp. Se preseleccionaron n=36 terneras con resultados negativos para ambas pruebas, tanto en las terneras como en sus respectivas madres. Luego de 60 días, se obtuvieron nuevas muestras de suero y orina de las 36 terneras, repitiendo el mismo procedimiento de análisis. Luego de aplicación de un plan sanitario para desparasitar y para prevenir enfermedades respiratorias, diarreicas, clostridiales y queratoconjuntivitis se entrenaron en la alimentación en comederos y se procedió al destete definitivo. Así se seleccionaron para el ensayo de infección experimental 20 terneras sanas de tres meses de edad, sin antecedentes de vacunación contra leptospirosis, y sin evidencia de infección por *Leptospira* spp (dos resultados de serología no reactivas al MAT y dos resultados de qPCR negativa en orina para la detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira*), con un peso promedio de 100 kg y de temperamento dócil.

El ensayo experimental se realizó en boxes ubicados en la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) de INIA en Tacuarembó (31° 44' 10.871" S 55° 58' 37.146" W). Los boxes están cercados en una zona aislada de otros animales, con acceso restringido, habilitado exclusivamente al personal involucrado en el ensayo. Con el objetivo de aclimatar las terneras a las condiciones de alojamiento, las mismas fueron transportadas a los boxes una semana antes del inicio del ensayo, y fueron agrupadas al azar en cinco grupos de n=4 terneras por grupo.

EL día del desafío, cada grupo experimental recibió 3 inoculaciones (a las 08:00am, 10:00am y 12:00am) de 500 ?l de una suspensión de 1x10⁸ leptospiras en fase exponencial de crecimiento por vía conjuntival y 500 ?l

de la misma suspensión bacteriana por vía intranasal. El grupo control fue inoculado con la misma frecuencia y vías de inoculación, pero con PBS 1x estéril.

Durante los 21 días del ensayo, se realizó un examen físico diario individual de las terneras, registrando parámetros de comportamiento, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, coloración de las mucosas, palpación de nódulos linfáticos y apetito. Se tomó el peso corporal en el día D0 previo a la infección, y a los 11 y 21 días post infección (DPI). Se colectaron muestras de sangre por venopunción yugular (D0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15 y 21 DPI) y muestras de orina (D0, 7, 14, 18 y 21 DPI) luego de la administración de diurético intramuscular (furosemida). La invasión bacteriana al torrente sanguíneo y/o la colonización renal con eliminación de bacterias en orina se evaluó mediante amplificación del gen *lipL32* por qPCR y cultivo microbiológico.

A los 21 DPI los animales fueron eutanasiados y evaluados para la búsqueda de lesiones macroscópicas. Durante la autopsia se colectaron y conservaron muestras de los distintos órganos para la detección de leptospiras en los diferentes órganos blanco mediante qPCR del gen *lipL32* y/o cultivo microbiológico, tal como se describió anteriormente para el modelo de infección en ratón. Para los estudios histopatológicos, fragmentos de tejidos fueron fijados en formol al 10 % bufferado (pH 7.2), durante 48 horas y posteriormente incluidos en parafina. Sesiones de tejidos de 4 μ m fueron sometidas a tinción con Hematoxilina y Eosina y analizadas en el Laboratorio de Histología de la PSA en INIA Tacuarembó utilizando microscopio óptico (BX53 Upright Microscope, Olympus, USA). Para la visualización de leptospiras se aplicó tinción argéntica (Warthin-Starry silver plating kit modified, Sigma-Aldrich, USA) e inmunomarcación por inmunohistoquímica en riñones incluidos en parafina.

Resultados, análisis y discusión

A partir de las curvas de crecimiento, y mediante recuento de bacterias viables en cámara de Petroff-Housser determinamos el tiempo de generación, para cada una de las cepas observando un crecimiento más lento para las variantes *L. borgpetersenii* Serjoe Hardjo y *L. noguchii* Australis. Las curvas de crecimiento mediante seguimiento de recuento de bacterias viables, móviles permitieron conocer para cada especie y serogrupo estudiado el máximo inóculo bacteriano alcanzable in vitro así como el momento de inicio de curva de muerte y lisis bacteriana (Anexo Tabla1, Figura 1). El conocimiento de estos parámetros de crecimiento in vitro resultó esencial para la preparación de los inóculos bacterianos a ser utilizados en los ensayos de experimentación in vivo en ambos modelos experimentales abordados en el proyecto.

II- Evaluación de virulencia de diferentes especies/serovares de *Leptospira* aisladas de bovinos en el modelo murino de infección subletal-crónico.

Se estudiaron los siguientes aislamientos autóctonos obtenidos de bovinos: *L. interrogans* sg. Pomona sv Kennewicki (LIP); *L. interrogans* Canicola Canicola (LIC), *L. borgpetersenii* Serjoe Hardjo (LBS), *Leptospira noguchii* Pyrogenes (LNP), *L. noguchii* Australis (LNAust), *L. noguchii* Autumnalis (LNA) y *L. noguchii* de serogrupo no determinado (LNND).

Evaluamos la capacidad de los diferentes aislamientos de infectar a través de una vía de inoculación por mucosas, así como su capacidad de invasión y colonización del parénquima renal a los 15 dpi. 4 grupos de n=4-6 ratones hembra C57BL/6J (8-10 semanas de edad), se inocularon por vía intranasal con 25 μ L de inóculo bacteriano conteniendo 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 leptospiras respectivamente. Se inocularon con PBS 1X pH 7.4 de manera similar un grupo control de n=2 animales por ensayo.

Para evidenciar el efecto de la infección en la fase aguda, se evaluaron cambios en el estado general y en el peso de los animales. Se observó una disminución significativa en el peso durante los primeros 4dpi en

animales desafiados con los tres inóculos más altos y en función de la dosis de *Leptospira* infectiva (Anexo Figura 2). Luego los animales recuperaron el peso hasta normalizarse con el del grupo control.

Todas las especies y serogrupos de *Leptospira* estudiadas demostraron capacidad de invasión a través de la mucosa nasal, provocando una fase de leptospiremia transitoria que se resolvió sin bacterias detectadas e sangre a los 7-8 dpi. Entre las 24 y 48 horas postinfección, los niveles de leptospiras en sangre fueron variables en función de los distintos inóculos infectivos (Anexo Figura 3). Entre las variantes de *L. noguchii*, las variantes Australis y Autumnalis fueron las que causaron mayores niveles de leptospiremia. Los mayores niveles de leptospiremia a las 48 hs se detectaron en animales infectados con *L. interrogans* Canicola Canicola (Anexo Figura 3).

Para evaluar mediadores de la inmunidad innata en el parénquima pulmonar por ser el tejido próximo luego de la invasión de la mucosa nasal, se determinaron los niveles de expresión de citoquinas, y quimiocinas pro-inflamatorias e iNOS en muestras de pulmón colectadas a las 48 hs post-infección. Se observó una mayor respuesta inflamatoria y de iNOS en el tejido pulmonar de animales infectados con las variantes de *L. borgpetersenii* (LBS) y *L. noguchii* Autumnalis (LNA), comparando con la respuesta observada en ambas variantes de la especie *interrogans* (LIC y LIP) (Anexo Figura 4). Estos hallazgos sugieren que LIC y LIP logran modular de manera diferencial la respuesta inmune innata a nivel del tejido pulmonar.

Se evidenció una fuerte respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira* por MAT en ratones infectados con todas las cepas estudiadas, excepto en los animales infectados con *L. noguchii* N/A en los cuales los títulos de anticuerpos fueron menores a 50. LIC, LIP, LBS, LNA, LNAust, LNP indujeron una respuesta humoral evidenciada a los 15 dpi por títulos de anticuerpos entre 1:200 hasta mayores a 1:6.400. Se observó disminución de títulos de anticuerpos en animales infectados con LBS y LNA (Anexo Figura 5 (A)), LNAust, LNPyr a los 30 y 60 dpi, mientras que los animales infectados con aislamientos de la especie *L. interrogans* (LIC y LIP) mantuvieron títulos de anticuerpos elevados hasta los 60 dpi (Figura 5-(A)).

Mediante la caracterización de tipos de inmunoglobulinas inducidas luego de la infección por mucosas, se evidenció el cambio de tipo de inmunoglobulinas IgM-IgG en animales infectados con las cuatro especies de *Leptospira*. A los 15 dpi, LIC, LIP y LBS indujeron mayores niveles de IgM, mientras que a los 60 dpi se observaron mayores niveles de IgG en animales infectados con LIC y LIP, con respuesta preponderantemente de subtipo IgG2c (Anexo Figuras 5-(B), (C)y(D)).

El estudio de cinética de excreción de leptospiras en orina de animales infectados con diferentes inóculos bacteriano de las distintas cepas de *Leptospira* reveló que solamente los serogrupos de la especie *L. interrogans* (Pomona Kennewicki y Canicola Canicola) lograron colonizar el tejido renal. Para ambas variantes de *L. interrogans* se observó excreción urinaria positiva a partir de los 7 dpi, la cual fue en aumento en ambos casos hasta los 30 dpi. Luego los niveles de leptospiruria se mantuvieron constantes hasta los 60 dpi, indicando el establecimiento y colonización de la bacteria en el tejido renal). La viabilidad bacteriana de ambos serogrupos en muestras de riñón fue confirmada mediante cultivo y aislamiento microbiológico a los 15 y 60 dpi (Anexo Figuras 6A y B). Interesantemente, variantes de aislamientos bovinos de las especies *L. borgpetersenii* y *L. noguchii* estudiadas, si bien lograron atravesar con éxito la barrera mucosa e invadir el torrente sanguíneo, no lograron establecer infección seguida de colonización del tejido renal, independientemente de la cantidad de leptospiras usadas en el inóculo infectivo. La Figura 6A resume los resultados de cinética de excreción urinaria y colonización renal de ratones infectados con 1×10^7 - 8 leptospiras de las variantes LIC, LIP, LBS, LNA. Dado que se obtuvieron los mismos resultados para las otras tres variantes de *L. noguchii* estudiadas, sólo se presentan gráficamente los resultados de la

variante Autumnalis (LNA).

Los hallazgos de co-localización de leptospiras de especie *L. interrogans* con lesiones histopatológicas a los 60 dpi, evidenciando nefritis intersticial cortical a nivel de los túbulos renales, confirman la capacidad virulenta de estas variantes de inducir una infección crónica en el modelo murino estudiado (Figura 7).

II- Evaluación de la capacidad infectiva a través de mucosas de cuatro serovariedades de especies patógenas de *Leptospira* aisladas de bovinos en un modelo de infección experimental en terneras de raza Bradford

Las cuatro cepas de aislados autóctonos estudiadas (LNA, LIP, LBS y LIC) demostraron capacidad infectiva a través de mucosas, con detección (+) en sangre u orina en al menos 1 ternera por grupo (Tabla 2). Sin embargo, ninguno de los animales infectados desarrolló sintomatología clínica de enfermedad aguda durante los 21 días, ni se observaron lesiones macroscópicas al momento de la eutanasia.

Todas las variantes estudiadas resultaron ser inmunogénicas, observándose mayores títulos de anticuerpos en terneras infectadas con LNA y LIC (Anexo Figura 8). Se destacan los bajos títulos de anticuerpos aglutinantes en el grupo de terneras infectadas con la variante LIP, con valores de 1:25 a 1:50). No se detectó seroconversión en ninguno de los animales del grupo control.

La capacidad de invasión de la mucosa nasal y ocular, con la consecuente diseminación hacia el torrente sanguíneos y órganos blanco quedó demostrada para las cuatro variantes estudiadas en este modelo: todas las variantes de *Leptospira* estudiadas fueron detectadas en hígado y riñón a los 21 DPI en al menos una ternera. Interesantemente la variante *L. noguchii* Autumnalis fue detectada en el tracto genital en el útero de 1 ternera (Tabla 3).

Si bien no se evidenciaron alteraciones macroscópicas, el estudio histopatológico en tejidos y órganos colectados en el punto final del experimento a los 21 dpi evidenció lesiones en riñón, hígado y corazón. Estas lesiones fueron de diferente intensidad según la cepa infectiva (Anexo tabla 4 y Figura 9). Se resalta como hallazgo patológico descrito en humanos pero aún no descrito en bovinos la observación de colecistitis en la vesícula biliar ocasionada por las cuatro cepas de *Leptospira* spp estudiadas (Anexo Tabla 4, Figura 9).

Conclusiones y recomendaciones

La leptospirosis es una enfermedad zoonóticas emergente cuyo agente etiológico son múltiples y diversos genotipos y fenotipos del género *Leptospira*. Además, una multiplicidad de hospederos mamíferos son susceptibles a la infección por estas diversas especies y serovares de *Leptospira*. El grado de severidad de la enfermedad, así como las manifestaciones clínicas asociadas a la infección pueden ser muy diversas según la combinación de la variante de *Leptospira* que la ocasiona y la especie de hospedero infectado. El ciclo de transmisión de la bacteria implica la eliminación de leptospiras en la orina de un hospedero crónicamente infectado contaminando el ambiente/suelo o contagiando por contacto directo con la orina a otro hospedero susceptible. Así, la leptospirosis resulta una zoonosis muy compleja y desafiante cuyo estudio debe necesariamente ser abordado desde la perspectiva de una sola salud.

La vigilancia epidemiológica continua incluyendo la caracterización de aislados de la bacteria de casos de leptospirosis tanto en humanos como en animales domésticos y de vida libre, resulta esencial para evaluar si las herramientas de control disponibles son adecuadas. La organización Mundial de Salud Animal es muy clara en su recomendación respecto a la formulación de vacunas anti-*Leptospira*: "La inmunidad inducida

mediante la vacunación es en gran medida específica de serotipo. Una vacuna debe formularse para su uso en una especie concreta de animal de una región geográfica concreta. Solo debe contener aquellos serotipos – y preferentemente aquellos genotipos – que causen problemas en la especie animal, o que se transmitan de una especie animal a otra en la región” (OMSA 2021). Así, poder conocer cuáles son los genotipos (especies) y fenotipos (serogrupos/serovares) que afectan a las especies productivas y causando enfermedad sintomática o crónica, es el primer paso para apuntar a la formulación de vacunas destinadas al control de la enfermedad de manera acorde a la epidemiología local y regional.

Este proyecto tomó como punto de partida datos epidemiológicos generados recientemente por el grupo de trabajo interinstitucional en leptospirosis (GTIL) donde quedó demostrado que hay genotipos y fenotipos de *Leptospiras* que infectan y enferman a los rodeos en Uruguay y que no están incluidos en las formulaciones de vacunas de uso veterinario en el país.

Abordamos el estudio de aspectos relacionados con la virulencia y patogenicidad de tres especies y 7 serogrupos diferentes de *Leptospira* aislados de bovinos infectados en Uruguay, mediante el uso de dos modelos de infección experimental. Logramos con éxito alcanzar los objetivos propuestos, identificando como principales logros del proyecto:

- Disponer de dos modelos de estudio in vivo que permiten la caracterización de aspectos relacionados con la virulencia, patogenicidad y capacidad de colonización renal. Ambos modelos quedan disponibles y con condiciones experimentales estandarizadas de manera que puedan ser de utilidad en el potencial desarrollo de nuevas vacunas anti-*Leptospira*.

- Conocer la capacidad infectiva a través de mucosas de *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* y *L. noguchii* en el hospedero murino (*Mus musculus*) y en el hospedero bovino.

- Conocer la capacidad diferencial de distintos genotipos y fenotipos de *Leptospira* para colonizar el parénquima renal. Estos resultados son novedosos y ponen de relevancia la necesidad de profundizar en el conocimiento de cuáles son los factores determinantes que permiten a las variantes de especie *L. interrogans* alcanzar y colonizar exitosamente el tejido renal; y por el contrario, son determinantes bacterianos o del hospedero los que impiden que *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. noguchii*, independientemente del serogrupo, alcancen y se establezcan en los túbulos renales en el hospedero murino?

- Confirmar la capacidad infectiva a través de mucosas y de diseminación de todas las variantes estudiadas en el modelo bovino: *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo, *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. interrogans* Canicola Canicola, *L. noguchii* Autumnalis. Si bien logramos detectar todas estas variantes de leptospirosis patógenas en la orina y/o el tejido renal de las terneras infectadas a los 21 días post infección, para concluir sobre la colonización renal y su duración en el tiempo es necesario realizar ensayos de mayor duración.

- Por último, y no menos importante, demostramos la inmunogenicidad de todas los genotipos y fenotipos de *Leptospira* estudiadas, quedando validadas como antígenos bacterianos a ser incluidos en nuevas formulaciones de bacterinas para uso veterinario en el país.

Entendemos que con los resultados logrados en el marco de este proyecto aportamos conocimiento de valor relacionado a la interacción hospedero-*Leptospiras* patógenas logrando un mejor entendimiento de la

fisiopatogenia de esta enfermedad zoonótica. Contar con modelos de infección experimental nos permitirá a futuro abordar aspectos relacionados con la enfermedad reproductiva en el bovino. Existen variantes de *Leptospira*, entre ellas *L. interrogans* Pomona Kennewicki, con la capacidad de ocasionar tormentas de aborto en bovinos, otras como *L. borgpetersenii* están asociadas a disminución en la fertilidad en los rodeos. Sin embargo poco se conoce acerca de cuáles son los mecanismos que desencadenan el aborto y/o la pérdida de fertilidad asociada a la infección por *Leptospira* spp.. Es una infección reciente, con la consecuente multiplicación bacteriana y respuesta inflamatoria exacerbada lo que desencadena el aborto? Es la infección transplacentaria que alcanza al feto y provoca muerte fetal? En hembras crónicamente por especies patógenas de *Leptospira* puede ocurrir una reactivación de la infección sistémica durante la preñez que afecte el normal desarrollo de la misma?

Por último, resaltamos como logro de este proyecto, la consolidación de equipos multidisciplinarios y complementarios, con fuerte compromiso en la formación de recursos humanos. Esto es un pilar esencial para definir, en función de los resultados logrados, cuáles son las mejores estrategias para abordar las interrogantes que surgen y que guían el estudio de la leptospirosis como enfermedad zoonótica de impacto en salud animal en Uruguay.

Referencias bibliográficas

- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 27;140(3-4):287-96, 2010.
- American Veterinary Medical Association (2007) AVMA guidelines on euthanasia. Pg 29.
- Bharti A, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Dis Lancet Infec*, 3 (12):757–771, 2003.
- Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res.* Jul;62(7):995-1000. 2001.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14560-5.
- Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol.* 9:186-194, 1971.
- Caimano MJ, Sivasankaran SK, Allard A, Hurley D, Hokamp K, Grassmann AA, Hinton JC, Nally JE. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *PLoS Pathog* Mar 13;10(3):e1004004. 2014.
- Chagas-Junior AD, McBride AJ, Athanazio DA, Figueira CP, Medeiros MA, Reis MG, Ko AI, McBride FW. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *J Med Microbiol.* 58(12):1632-7, 2009.
- Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darce S, Badell E, d'Andon MF, Winter N, Lacroix-Lamandé S, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A, Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol.* 183(4):2669-77, 2009.
- Conrad NL, Cruz McBride FW, Souza JD, Silveira MM, Félix S, Mendonça KS, Santos CS, Athanazio DA, Medeiros MA, Reis MG, Dellagostin OA, McBride AJ. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 16;11(3):e0005441, 2017.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(9):e0003898, 2015.
- De Oliveira D, Figueira CP, Zhan L, Pertile AC, Pedra GG, Gusmão IM, Wunder EA, Rodrigues G, Ramos EA, Ko AI, Childs JE, Reis MG, Costa F. *Leptospira* in breast tissue and milk of urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect.* 144(11):2420-9, 2016.
- Dib C.C., Gonçalves A.P., Morais Z.M. Cross-protection between experimental anti-leptospirosis bacterins. *Braz J Microbiol.* 45(3):1083–1091, 2014.
- Easton, C. Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2006.
- Elder JK, McKeon GM, Duncalfe F, Ward WH, Leutton RD. Epidemiological studies on the ecology of *Leptospira interrogans* serovars pomona and hardjo in Queensland. *Prev Vet Med* 3:501–521, 1986.
- Ellis WA, Michna SW. Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to the Hebdomadis serogroup. *Res Vet Sci.* 22(2):229-36, 1977.
- Ellis WA. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 387:99-137, 2015.
- European Pharmacopoeia (2014). Monograph 01/2002:0447: *Leptospira* vaccine for veterinary use. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, p. 937-938. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira* and Leptospirosis. MedSci, Melbourne, Australia, 2nd Ed., 2000.

Fanton d'Andon M, Quellard N, Fernandez B, Ratet G, Lacroix-Lamande S, Vandewalle A, et al. *Leptospira interrogans* induces fibrosis in the mouse kidney through Inos-dependent, TLR- and NLR-independent signaling pathways. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1):e2664, 2014.

Gomes-Solecki M., Santecchia I. and Werts C. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. *Front. Immunol.*8:58, 2017.

Hamond C, Pinna M, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W, Picardeau M. Multilocus variable number tandem repeat analysis assay provides high discrimination for genotyping *Leptospira santarosai* strains. *J Med Microbiol.* 64:507-12, 2015.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J Exp Med* 23(3):377-402, 1916.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 7(10):736-47, 2009.

Libonati H, Pinto PS, Lilenbaum W. Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. *Microb Pathog.* 2017 Jul;108:101-103.

Loureiro AP, Pestana C, Medeiros MA, Lilenbaum W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Anim Reprod Sci.* 178:50-54, 2017.

Martins G, Loureiro AP, Hamond C, Pinna MH, Bremont S, Bourhy P, Lilenbaum W. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol Infect.* 143(7):1538-41, 2015.

McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 18(5):376-86, 2005.

Matsui M, Roche L, Geroult S, Soupé-Gilbert ME, Monchy D, Huerre M, Goarant C. Cytokine and chemokine expression in kidneys during chronic leptospirosis in reservoir and susceptible animal models. *PLoS One* 11(5), 2016.

Meny P, Menéndez C, Quintero J, Hernández E, Ríos C, Balassiano IT, Trindade CNDR, Vital-Brazil JM, Ramos TMV, Ashfield N, Feble C, Avila E, Schelotto F, Varela G. Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 21; 59:e79, 2017.

Momtaz, H, Moshkelani, S. Detection and characterization of *Leptospira* spp. isolated from aborted bovine clinical samples. *Acta Vet. Brno.*81:21-25, 2012.

Monte LG, Ridieri KF, Jorge S, Oliveira NR, Hartwig DD, Amaral MG, Hartleben CP, Dellagostin OA. Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*40:41-5, 2015.

Natarajaseenivasan K, Ratnam S. Experimental leptospirosis in laboratory mice and rats. *J Commun Dis* 29(3):291-3, 1997.

Picardeau, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol.* 15(5):297-307, 2017.

Radostits, O. M.; Mayhew, I. G. J.; Houston, D. M. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. Ediciones Harcourt. p771, 2002.

Reis, MO, Caprioli, RA, Laisse, CJM, Guimarães, LLB., Andrade, CP, Boabaid, FM, Sonne, L, Driemeier, D. Surto de leptospirose em bezerros criados em resteva de arroz. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(9): 937-940, 2017.

Repiso M., Gil A., Bañales P., D'Anatro N., Fernández L., Guarino H., Herrera B., Núñez A., Olivera M., Osawa T., Silva M. 2005. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria.* 40:5-28, 2005.

Sanhueza JM, Heuer C, West D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev Vet Med.* 112 (1-2):90-8, 2013.

Sanhueza JM; Wilson PR; Benschop J; Collins-Emerson JM; Heuer C, Meta-analysis of the efficacy of *Leptospira* serovar Hardjo vaccines to prevent urinary shedding in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*

May 01; Vol. 153, pp. 71-76, 2018.

Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Brod CS, Reis MG, Dellagostin OA, Ko AI. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 26(31):3892-6, 2008.

Silva EF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanazio DA, Pinto LS, Queiroz A, Ko AI, Brod CS, Dellagostin OA. *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. (4):621-3, 2009.

Suanes, A.S. *Leptospirosis bovina: enfermedad, epidemiología y diagnóstico serológico*. Publicación académica da Academia de Medicina Y medicina Veterinaria: Leptospirosis. Montevideo, Uruguay. 2013.

Sullivan ND. Experimental infection of pregnant cows with *Leptospira hardjo*. *Aust Vet J*. 46(4):123-5, 1970.

Sullivan JP, Nair N, Potula H-H, Gomes-Solecki M. Eyedrop inoculation causes sublethal leptospirosis in mice. *Infect Immun* 85:e01050-16, 2017.

Thiermann AB. The Norway rat as a selective chronic carrier of *nLeptospira Icterohaemorrhagiae*. *J Wildl Dis* 17(1):39-43, 1981.

Thiermann AB. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *AmJ Vet Res*. 43(5):780-4, 1982.

Thurmond MC, Picanso JP, Hietala SK. Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. *J VetDiagn Invest*. Oct;2(4):274-82, 1990.

Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Study on the efficacy of *Leptospira* vaccines developed from serovars isolated from Trinidad and comparison with commercial vaccines using a hamster model. *Vaccine*. 26; 28(33):5421-6. 2010.

Wunder EA Jr, Figueira CP, Santos GR, Lourdault K, Matthias MA, Vinetz JM, Ramos E, Haake DA, Picardeau M, Dos Reis MG, Ko AI. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. *Infect Immun*. 84(7):2105-15, 2016.

Zarantonelli ML, Huerre M, Taha MK, Alonso JM. Differential role of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* in virulence and inflammatory response during respiratory infection in mice. *Infect Immun*. 74(10):5506-12, 2006.

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, Rodríguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto F, Riet-Correa F, Buschiazzi A; Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis Consortium. 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*. 13;12(9). 2018.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)