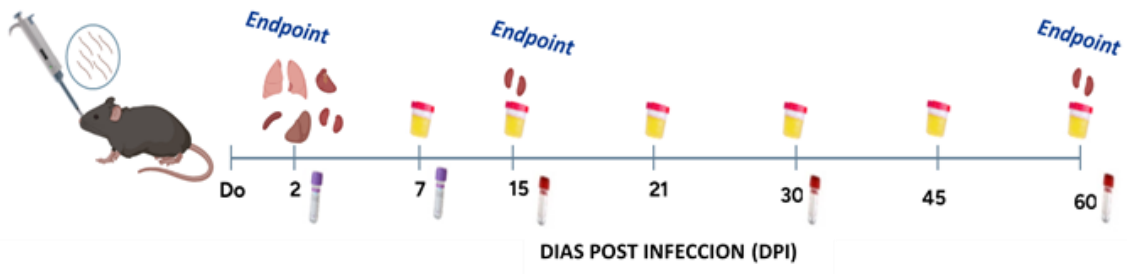


Sección Metodología/Diseño del estudio

Esquema 1



Sección Resultados, análisis y discusión

I- Estudio de las características de crecimiento *in vitro* de distintos genotipos (especies) y fenotipos (serogrupos) de *Leptospira* spp aisladas de bovinos.

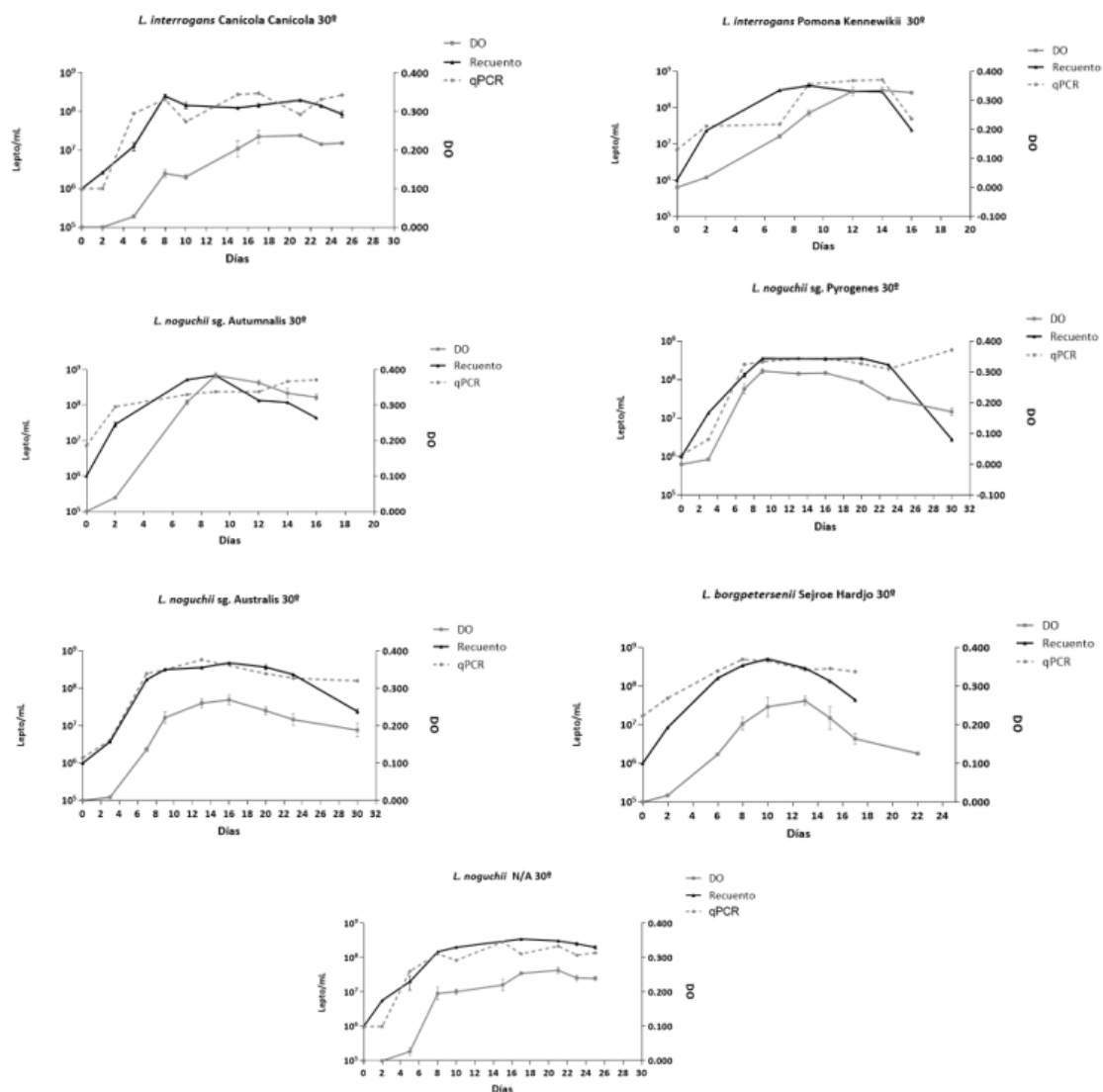


Figura 1. Curvas de crecimiento *in-vitro* de las distintas variantes del *Leptospira* spp estudiadas. Se siguió el crecimiento bacteriano mediante determinación de la Densidad Óptica (DO) a 420 nm, recuento de bacterias viables en cámara de Petroff-Hausser y mediante cuantificación del número de genomas bacterianos mediante PCR cuantitativa en tiempo real qPCR utilizando como target el gen *lipL32*

Tabla 1: Tiempos de generación de especies patógenas de *Leptospira* aisladas de bovinos

Aislamiento	Pendiente	Tiempo de generación (horas)	Tiempo en llegar al máximo inóculo (días)	Máximo inóculo alcanzable (leptospiras/mL)
<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki	0,29	25	8	4.20E+08
<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola	0,30	24	9	1.80E+08
<i>L. noguchii</i> N/A	0,27	24	16	3.70E+08
<i>L. noguchii</i> Autumnalis	0,32	23	9	7.10E+08
<i>L. noguchii</i> Pyrogenes	0,28	25	9	3.60E+08
<i>L. noguchii</i> Australis	0,28	26	16	5.10E+08
<i>L. borgpetersenii</i> Sejroe Harjo	0,27	27	10	5.30E+08

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

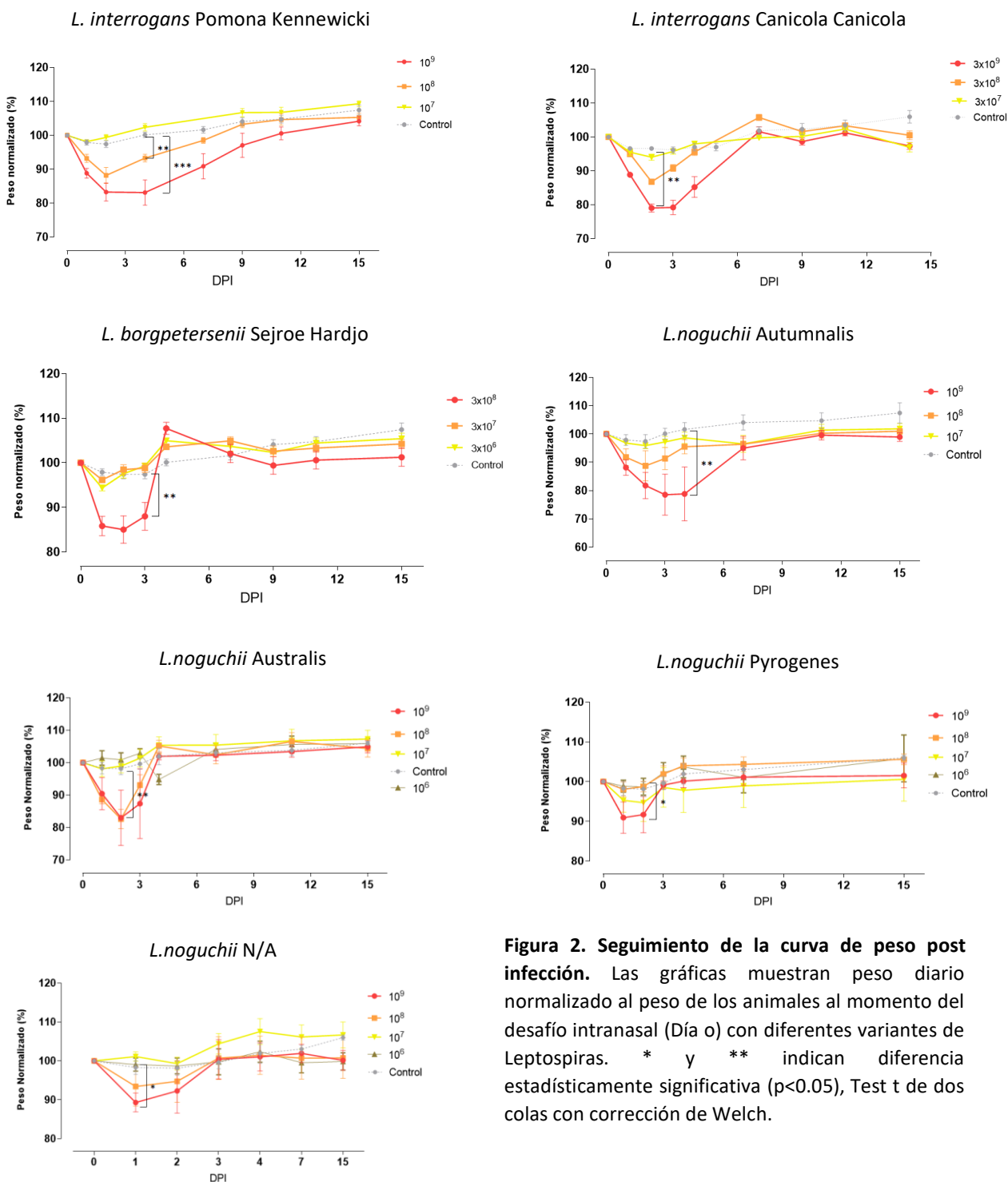
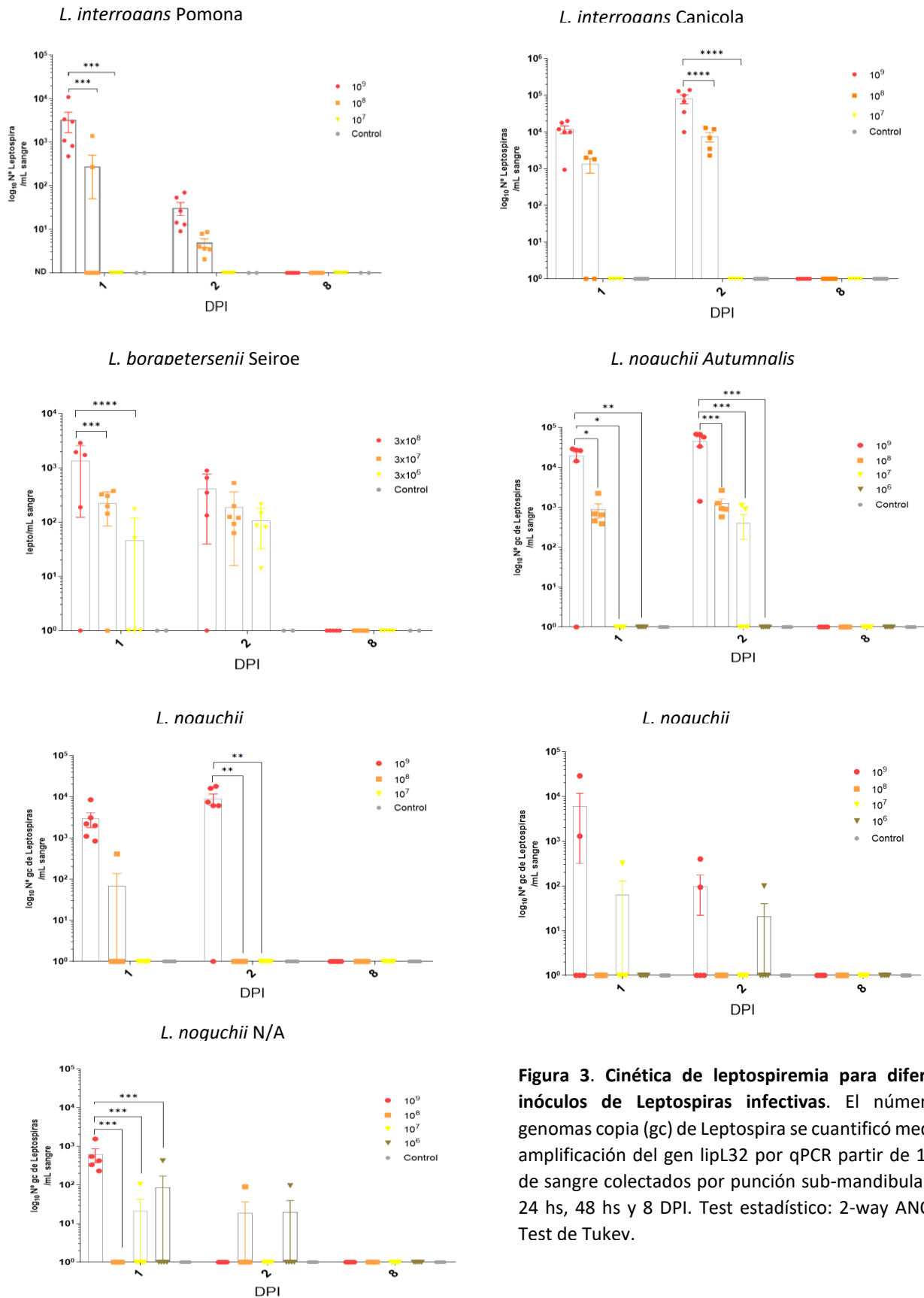
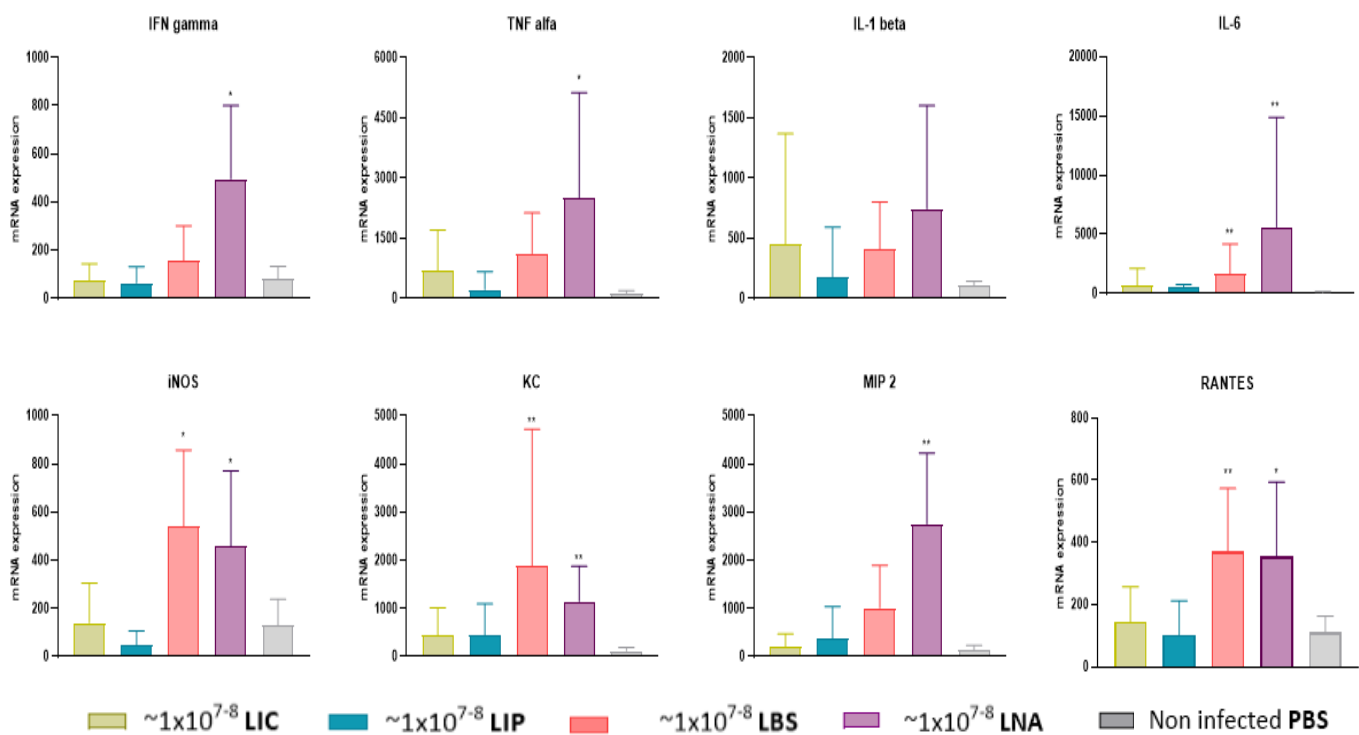


Figura 2. Seguimiento de la curva de peso post infección. Las gráficas muestran peso diario normalizado al peso de los animales al momento del desafío intranasal (Día 0) con diferentes variantes de *Leptospiras*. \* y \*\* indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), Test t de dos colas con corrección de Welch.

# Proyecto FSA\_1\_2018\_1\_152689 - ANEXO Informe Final - Figuras y Tablas

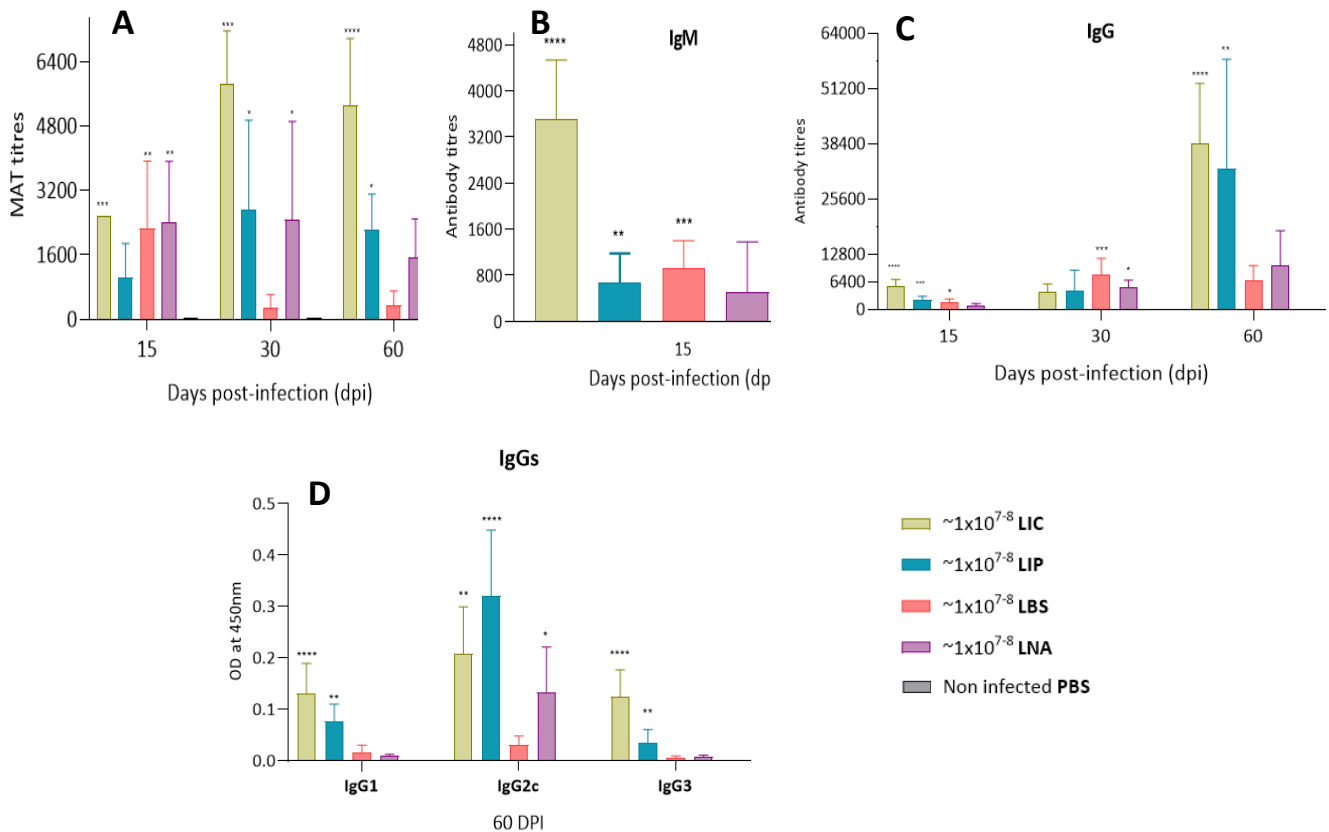


**Figura 3. Cinética de leptospiremia para diferentes inóculos de Leptospiras infectivas.** El número de genomas copia (gc) de Leptospira se cuantificó mediante amplificación del gen lipL32 por qPCR partiendo de 100 µL de sangre colectados por punción sub-mandibular a las 24 hs, 48 hs y 8 DPI. Test estadístico: 2-way ANOVA – Test de Tukey.

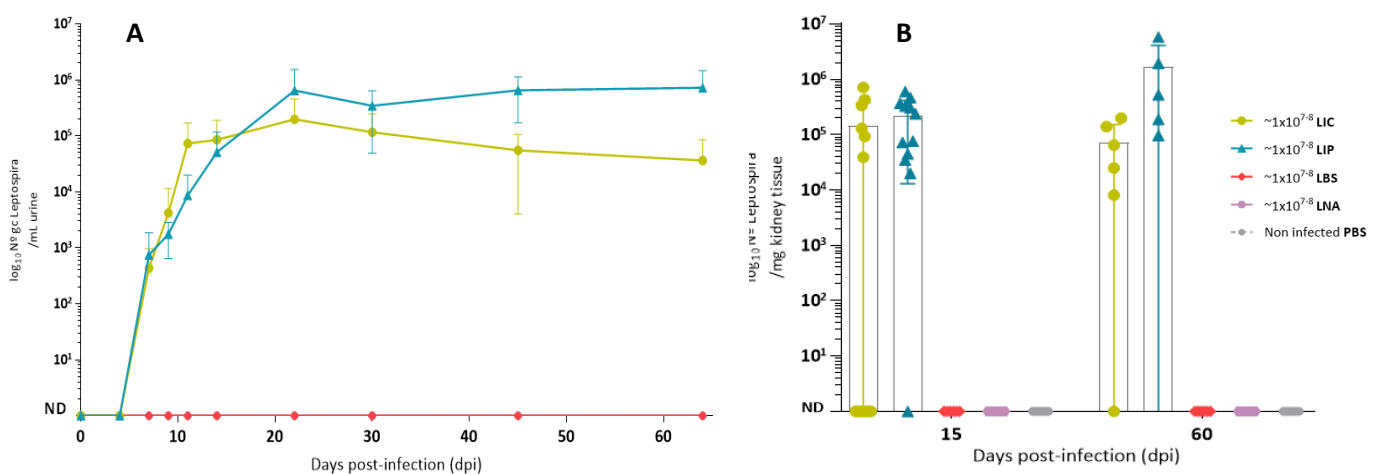


**Figura 4. Expresión de mediadores pro-inflamatorios en tejido pulmonar.** Los gráficos representan los niveles de transcritos de ARN mensajero de citoquinas, quimiocinas e iNOS cuantificados por RT-qPCR. Los valores representan la media  $\pm$  SD (SD) del nivel de transcritos de ARNm en el tejido pulmonar y de n=5-6 ratones eutanasiados a las 48 hs post-infección por vía intranasal, usando como calibrador interno los niveles de ARNm del gen de la  $\beta$ -actina. Se comparó el nivel de transcritos en tejido de animales infectados versus animales control mediante el Test de Mann-Whitney. P values: \*\*\*\* p<0.0001; \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01, \*p<0.05

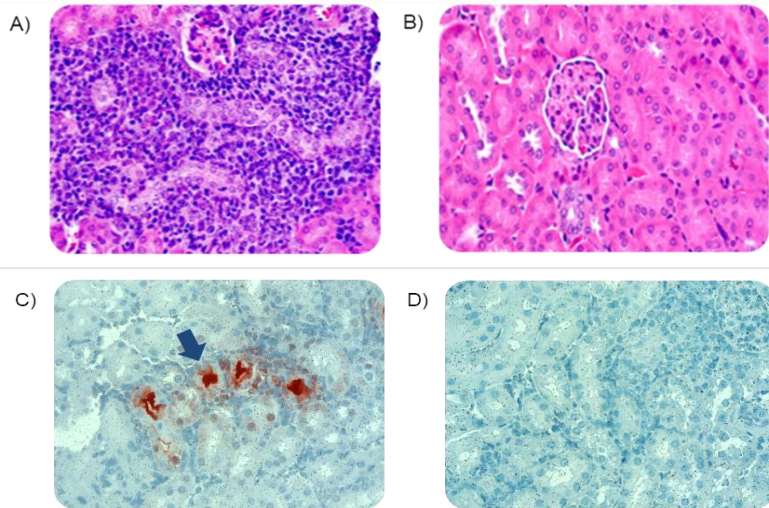
# Proyecto FSA\_1\_2018\_1\_152689 - ANEXO Informe Final - Figuras y Tablas



**Figura 5. Estudio de la respuesta humoral en ratones infectados con aislados bovinos de *Leptospira* spp.** (A) Cinética de títulos de anticuerpos aglutinantes anti-leptospira determinados por MAT a los 15, 30 y 60 dpi. (C) Los títulos de anticuerpos de isotipo IgM a los 15 dpi (B) y de isotipo IgG a los 15, 30 y 60 dpi fueron determinados mediante un ELISA in house. Se utilizó como antígeno un extracto total de leptosiras obtenido mediante sonicación de bacterias en fase exponencial de crecimiento homólogas a las usadas en la infección. (D) Los niveles de los diferentes subtipos de IgG en ratones infectados con las distintas variantes de *Leptospira* se determinó mediante ELISA in house a los 60 dpi. Los valores representan la media  $\pm$  SD (SD). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , mediante Kruskal-Wallis test.



**Figura 6. Colonización renal y cinética de excreción de leptosiras en orina.** Los datos representan la cuantificación bacteriana mediante análisis del gen lipL32 gene en (A) muestras de orina y (B) en el tejido renal de n=10-12 ratones por grupo a los 15 dpi, y de n=5-6 ratones por grupo a los 60 dpi. Los valores representan la media  $\pm$  SD.



**Figura 7. Lesiones histopatológicas en riñón de ratón infectado con *L. interrogans Pomona Kennewicki* (60 dpi).** Secciones de riñón teñidas con hematoxilina-eosina muestran nefritis intersticial cortical grave, caracterizada por infiltración de linfocitos, histiocitos y neutrófilos ocasionales en el intersticio cortical de ratones infectados **(A)**, indicativa de patología renal crónica. La fuerte inmunomarcación en la luz de los túbulos proximales en ratones infectados **(C)** confirma la colonización de los túbulos renales. **(B)** y **(C)**: secciones de tejido renal de ratones control, no infectados

## Proyecto FSA\_1\_2018\_1\_152689 - ANEXO Informe Final - Figuras y Tablas

### 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

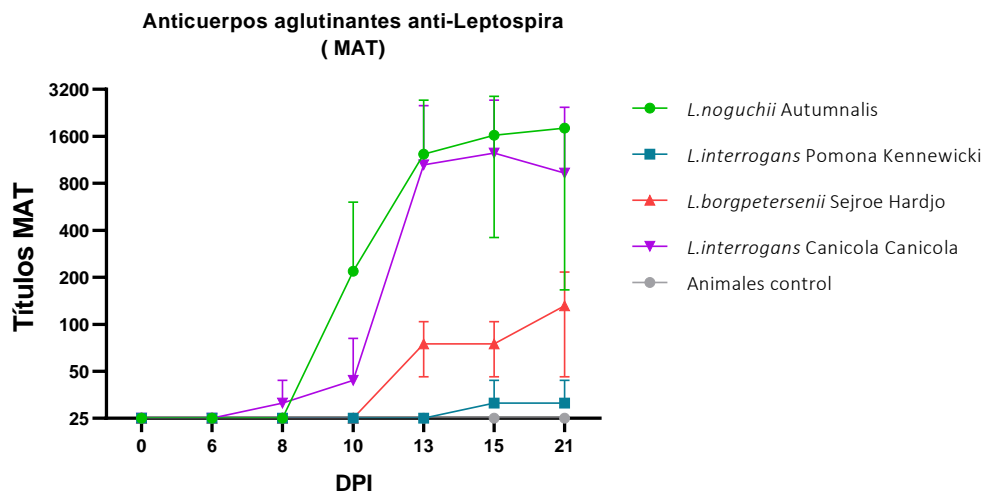
**Tabla 2:** Detección de leptospiras en sangre y orina mediante amplificación del gen lipL32 en terneras infectadas por vía de mucosas con cuatro variantes autóctonas de *Leptospira* spp

Identificación animal	D0*		D1		D2		D7		D13	D17	D21
	S	O	S	O	S	O	S	O	O	O	O
<b>GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis</b>											
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO B <i>L. interrogans</i> sg Pomona sv. Kennewicki</b>											
B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> sg Sejroe sv. Hardjo</b>											
C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>GRUPO D <i>L. interrogans</i> sg Canicola sv. Canicola</b>											
D13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>GRUPO CONTROL</b>											
GC17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GC20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D: días post-infección; S: sangre; O: orina

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





**Figura 8.** Cinética de la respuesta humoral en terneras infectadas con aislados autóctonos de *Leptospira* spp. Los valores representan la media  $\pm$  SD de títulos de anticuerpos aglutinantes contra la cepa homóloga usada como inóculo de infección

**Tabla 3:** Detección de leptospiras en tejidos y órganos de terneras infectadas a los 21 días pos tinfeción

Identificación Animal	Bazo*	Corazón*	Pulmón*	Hígado**	Humor Vítreo**	Útero**	Riñón**
<b>GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnnalis</b>							
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	+	-
A3	-	-	-	+	-	-	+
A4	-	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO B <i>L. interrogans</i> sg Pomona sv Kennewicki</b>							
B5	-	-	-	+	-	-	-
B6	-	-	-	-	-	-	+
B7	-	-	-	-	-	-	+
B8	-	-	-	-	-	-	+
<b>GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> sg Sejroe sv Hardjo</b>							
C9	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	+	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	+
<b>GRUPO D <i>L. interrogans</i> sg Canicola sv Canicola</b>							
D13	-	-	-	+	-	-	-
D14	-	-	-	-	-	-	-
D15	-	-	-	-	-	-	-
D16	-	-	-	+	-	-	+
<b>GRUPO CONTROL</b>							
GC17	-	-	-	-	-	-	-
GC18	-	-	-	-	-	-	-
GC19	-	-	-	-	-	-	-
GC20	-	-	-	-	-	-	-

\* Muestras analizadas por qPCR

\*\*Muestras analizadas por qPCR y cultivo microbiológico

# Proyecto FSA\_1\_2018\_1\_152689 - ANEXO Informe Final - Figuras y Tablas

**Tabla 4:** Lesiones microscópicas en órganos de terneras a los 21 días post infección con cuatro cepas de *Leptospira* spp autóctonas

Nº Animal	RIÑÓN	HÍGADO			VESÍCULA BILIAR	CORAZÓN	
	Nefritis intersticial	Necrosis hepatocelular	Infiltrado periportal	Hipertrofia de las células de Kupffer	Colecistitis	Miocarditis	Epicarditis
<b>GRUPO A <i>L. noguchii</i> sg Autumnalis</b>							
A1	-	+	+	+	+	+	-
A2	+	-	+	+	+++	-	+
A3	-	-	+	+	+	-	+
A4	-	-	+	+	-	++	+
<b>GRUPO B <i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki</b>							
B5	+	-	++	+	-	+	-
B6	++	-	+	+	+	-	-
B7	+++	-	+	+	NE	-	-
B8	+	+	+	+	+	+	-
<b>GRUPO C <i>L. borgpetersenii</i> Sejroe Hardjo</b>							
C9	-	-	+	+	NE	-	-
C10	++	-	+	+	+	+	-
C11	+	-	+	+	+++	+	-
C12	++	-	+	+	+++	+	-
<b>GRUPO D <i>L. interrogans</i> Canicola Canicola</b>							
D13	-	-	+	+	+++	+	+
D14	+	-	+	-	+	-	-
D15	+	-	+	+	+++	+	+
D16	+	+	+	+	+++	+	-
<b>GRUPO E - No infectadas</b>							
E17	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-
E19	-	-	-	-	-	-	-
E20	-	-	-	-	-	-	-

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

NE: no evaluado



**Figura 9.** Hallazgos histopatológicos en terneras infectadas con aislados autóctonos de *Leptospira* spp. (A) Foco de nefritis tubulointersticial linfohistiocítica. HE, 400x. (B) Necrosis hepatocelular asociada a infiltrado linfohistiocitario. HE, 400x. (C) Miocarditis linfohistiocítica perivascular. HE, 400x. (E) Colecistitis linfohistiocítica focalmente extensa. La presencia de *Leptospiras* en la luz de túbulos corticales se evidenció mediante tinción argéntica, 400x. (D) e inmunohistoquímica, 100x (F) (ver flechas).