

Resumen

La Leptospirosis es una zoonosis con distribución mundial causada por cepas del género *Leptospira*. Se estima que ocurren más de 1 millón de casos anuales de esta enfermedad en seres humanos, con casi 60.000 muertes por año.

Las leptospiras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Afectan a los seres humanos y a diversos animales de producción, domésticos y silvestres.

La patología de muchos animales de producción y las pérdidas económicas que conlleva han sido por mucho tiempo los principales incentivos para el estudio en nuestro medio de esta zoonosis, pero la enfermedad humana ocasiona igualmente daños relevantes que requieren atención.

El **objetivo** de este trabajo es comunicar los resultados del estudio realizado durante 20 años por nuestro equipo multidisciplinario sobre una enfermedad y un agente poco atendidos por el personal de salud humana, sobre el amplio reservorio animal que alberga estos gérmenes, y transmitir conocimientos obtenidos con el enfoque “**Una Salud**” sobre la vinculación entre ambos campos de difusión de estas infecciones, para optimizar orientaciones sobre su manejo, prevención y control.

Se cumplieron diferentes etapas de estudio, incluyendo el registro de datos clínicos y epidemiológicos de pacientes infectados, el análisis de muestras de diferentes grupos humanos de riesgo, de animales y ambientales; se valoraron las capacidades y prácticas de grupos comparables de médicos y veterinarios; se incorporaron y evaluaron distintos procedimientos de laboratorio diagnóstico; se realizó el cultivo, identificación y comparación de los aislamientos de *Leptospira* de distintos orígenes utilizando procedimientos convencionales y varias técnicas de biología molecular.

La gran mayoría de los individuos con infección confirmada por *Leptospira* eran varones jóvenes que habitan fuera del departamento de Montevideo. Las **actividades rurales** realizadas por la mayoría de los mismos fueron: producción lechera, ganadería bovina y ovina, agricultura, cultivo y cosecha de arroz, explotación forestal, transporte y faena de ganado, y otros trabajos de riesgo relacionados. Fiebre, astenia, artromialgias y cefalea estuvieron presentes en el 80 a 100% de estos pacientes. La incidencia anual estimada de infección por *Leptospira* es de al menos 15/100.000 habitantes. El número anual de muertes nunca fue superior a 10. La enfermedad es tratable precozmente con betalactámicos, y resulta más grave en personas mayores de 40-50 años.

La Técnica de MicroAglutinación MAT con cepas vivas de *Leptospira* fue incorporada con éxito en nuestro laboratorio. Los criterios de interpretación y títulos de corte definidos en ensayos preliminares probaron ser efectivos en su aplicación diagnóstica. Requiere estudiar dos muestras de suero del paciente: una precoz y otra a los 15 días. Los serogrupos intensamente reactivos en las pruebas MAT diagnósticas **no deben considerarse como las variantes efectivamente infectantes**, porque existe amplia reactividad cruzada en la fase aguda de la enfermedad.

La sensibilidad y especificidad del ensayo de **IFI-IgM propia** para sueros de fase aguda fue de 79% y 100%, respectivamente. El valor predictivo positivo (VPP) fue de 100%.

Para la prueba de **aglutinación macroscópica** con antígeno termorresistente sobre una primera muestra de suero, la sensibilidad fue de 67,72% y la especificidad 85,38%.

La sensibilidad de la **prueba ELISA** fue de 95% y la especificidad 95,83%; el VPP fue 0,8008 y el VPNegativo fue 0,9908.

El **test inmunocromatográfico** comercial resultó altamente específico para detección de IgM (97%) pero tuvo baja sensibilidad global (47%), y en ningún caso se obtuvo resultado positivo para IgG.

Estos ensayos, pero en especial el ELISA y la IFI-IgM permiten el diagnóstico presuntivo precoz en más de 50% de los sujetos con Leptospirosis aguda y primera prueba MAT negativa. Habilitan rápidas decisiones terapéuticas o de manejo cuando se precisan, especialmente para miembros de grupos en riesgo. Evitan además el manejo rutinario complejo de cultivos vivos.

La reacción de **qPCR** pudo detectar hasta 10² leptospiras/ml en muestras de sangre, plasma, y precozmente de suero, contaminadas experimentalmente. Mostró una sensibilidad del 30% y no tuvo falsos positivos. Quedó demostrada la gran dificultad del aislamiento desde hemocultivos humanos, que no fue útil para

diagnóstico temprano de la infección. **Sin embargo, tiene mucho valor en laboratorios de referencia, para poder caracterizar las cepas circulantes y establecer vínculos epidemiológicos.**

Siete aislamientos humanos pudieron ser caracterizados como *Leptospira interrogans* Pomona Pomona; *L. interrogans* Pomona Kennewicki; *L. interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola o Portlandvere; *L. interrogans* serogrupo Sejroe, serovar Wolffii o Romanica, *L. kirschneri* Australis Ramisi, *L. kirschneri* serovar Mozdok y *L. borgpetersenii* Ballum Ballum. Procedían de trabajadores rurales relativamente añosos y con enfermedad severa.

Se recuperaron **9 cepas ambientales**, 6 de ellas identificadas como *Leptospira biflexa*, una como *Leptonema illini*, y dos como *Leptospira meyeri*, especie saprofítica o parcialmente patogénica.

Las cepas recuperadas de bovinos fueron mayoritariamente *L. interrogans* Pomona Kennewicki, *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo, *L. noguchii* serogrupo Autumnalis, y un solo aislamiento *L. interrogans* Canicola Canicola.

Las respuestas de médicos y veterinarios sobre sintomatología, diagnóstico y prevención fueron similares y revelan conocimientos en general adecuados. Los médicos reconocieron más la tos y otras manifestaciones respiratorias como expresión posible de la enfermedad, pero no son conscientes de la diversidad del reservorio animal ni de la orina animal como fuente principal de infección humana.

En integrantes de **grupos humanos en riesgo** 46,3% de los sueros reaccionaron con antígenos específicos en IFI y/o MAT, revelando contacto con *Leptospira*. La seroprevalencia en grupos representativos de la población general no fue mayor de 15%. Los trabajadores de tambos revelaron más frecuente reactividad que los trabajadores de arrozales o reciclado de residuos. Los sueros de mujeres fueron más frecuentemente reactivos que los de hombres, especialmente en barrios marginales; lo contrario ocurrió en los trabajadores de tambos. La mayoría de las personas analizadas y de los sueros reactivos pertenecían a los grupos más jóvenes, pero pocos a niños.

La **exposición directa o indirecta a animales** y el **uso de agua no-potable** fueron las principales condiciones asociadas con la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*. El contacto **con animales**, especialmente bovinos, no tanto ratas, es factor de riesgo relevante para desarrollar leptospirosis, pero se requieren todavía más datos epidemiológicos e identificación comparada de aislamientos humanos y animales para optimizar las medidas de prevención y control de esta zoonosis.

Summary

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by strains of the genus *Leptospira*. It is estimated that more than 1 million cases occur each year in humans, with more than 60,000 annual deaths. *Leptospira* strains are widely distributed in nature. They affect humans, livestock, domestic and wild animals.

Livestock diseases and the economic losses they entail have long been the main incentive for the study of this zoonosis, but human infection also causes significant damage that requires attention.

The **aim** of this work is to communicate the results of the long term study carried out over 20 years by our work team about a disease and an etiologic agent poorly attended by human health personnel, on the large animal reservoir that harbors these bacteria, and to transmit obtained knowledge with the “**One Health**” approach on the link between both fields of spread of these infections, in order to optimize guidelines for their management, prevention and control.

Different study steps were accomplished, including the registration of clinical and epidemiological data from infected patients; the analysis of samples from human groups at risk, from animals and the environment; the assessment of knowledge and practices of comparable groups of medical doctors and veterinarians; the evaluation and fine tuning of different diagnostic laboratory procedures; the isolation, identification and comparison of *Leptospira* from different origins, that was carried out using conventional procedures and various molecular biology techniques.

Most individuals with confirmed *Leptospira* infection were young men living outside Montevideo department. The **rural activities** they carried were: dairy production, cattle and sheep farming, agriculture,

rice cultivation and harvesting, forestry, transportation and slaughter of livestock, and other related risk jobs. Fever, asthenia, arthromyalgia, and headache were present in 80-100% of these patients. The estimated annual incidence of *Leptospira* infection is at least 15/100,000 inhabitants. The annual number of deaths was never higher than 10. The disease is early treatable with beta-lactams, and is more serious in people over 40-50 years.

The Micro Agglutination Technique **MAT** with live *Leptospira* strains was successfully incorporated into our laboratory. The interpretation criteria and cut-off titles defined in preliminary trials proved to be effective in their diagnostic application. It requires studying two serum samples from the patient: an early one, and another 15 days later. **The highly reactive serogroups in diagnostic MAT tests should not be considered as the infecting variants**, because there is extensive cross-reactivity in the acute phase of the disease.

The sensitivity of IFI test for **total antibodies** in the initial samples was 67.63% and the specificity was 91.07%, with a positive predictive value (PPV) of 92.13%.

The sensitivity and specificity of the **IFI-IgM** assay for acute phase sera was 79% and 100%, respectively. The PPV was 100%.

The sensitivity of the **macroscopic agglutination test with heat resistant antigen** applied to a first serum sample was 67.72%, and its specificity was 85.38%.

The developed **ELISA test** had a 95% sensitivity, and its specificity was 95.83%. The PPV and Negative Predictive Value (NPV) were 0.8008 and 0.9908 respectively.

The **commercial immunochromatographic test** was highly specific for the detection of IgM (97%) but had a low overall sensitivity (47%), and no analyzed serum yielded a positive IgG result.

These assays, but particularly the ELISA and IFI-IgM tests allow an early presumptive diagnosis in more than 50% of patients with acute Leptospirosis and negative first MAT result. They skip the complicated use of live *Leptospira* cultures, and enable quick therapeutic decisions when they are required, especially for members of human groups at risk, but have the disadvantage (as qPCR) that they do not identify the infecting strain.

The **qPCR** reaction was able to detect up to 10^2 leptospores/ml in contaminated serum, plasma or whole blood samples; the detection occurred earlier in experimentally contaminated serum samples. It showed a sensitivity of 30% and had no false positives results.

The isolation of *Leptospira* from human blood cultures was of proven difficulty, and was not useful for early diagnosis of infection. **However, it is very important to try it in reference laboratories, in order to characterize the circulating strains and establish epidemiological links.**

Seven isolates from relatively old and severely ill rural workers could be characterized as *Leptospira interrogans* Pomona Pomona; *L. interrogans* Pomona Kennewicki; *L. interrogans* serogroup Canicola serovar Canicola o Portlandvere; *L. interrogans* serogroup Sejroe, serovar Wolffi o Romanica; *L. kirschneri* Australis Ramisi, *L. kirschneri* serovar Mozdok and *L. borgpetersenii* Ballum Ballum.

Nine environmental isolates were recovered, 6 of which were identified as *Leptospira biflexa*. Another strain was identified as *Leptonema illini*, and two cultures corresponded to *Leptospira meyeri*, a saprophytic or partially pathogenic species.

The responses of physicians and veterinarians regarding symptoms, diagnosis, and prevention were similar and globally reveal an adequate knowledge. Physicians more frequently recognize cough and other respiratory manifestations as a possible expression of leptospirosis, but they are not aware of the diversity of the animal reservoir, nor identify the animal urine as the main source of human infection.

In members of human groups at risk, 46.3% of the sera reacted with specific antigens in IFI and/or MAT, revealing contact with *Leptospira*. The seroprevalence in representative groups of the general population was not greater than 15%. The dairy workers revealed more frequent reactivity than the rice or waste recycling workers. Women's sera were more frequently reactive than men's, especially in slums; the opposite occurred in dairy workers. Most of the people tested and the reactive sera belonged to the younger groups, but few to children.

Direct or indirect exposure to animals and the use of unsafe water were the main conditions associated with the presence of anti-*Leptospira* antibodies. Contact with animals, mainly bovines, not so much rats, is a relevant risk factor for developing Leptospirosis, but more epidemiological data and comparative identification of human and animal isolates are still required to optimize prevention and control measures for this zoonosis.

Palabras clave: Leptospirosis; MAT; aislamientos; aspectos clínicos; epidemiología; reservorio animal; grupos humanos de riesgo.

Key words: Leptospirosis; MAT; isolates; clinical aspects, epidemiology; animal reservoir; human risk groups.

Fuentes de Financiación: Durante este tiempo hemos recibido apoyo económico de: Fundación “Manuel Pérez”; Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC UdelaR), programa de Inclusión Social, 2014; CSIC, programa Grupos I+D, 2010; Agencia Nacional de Investigación e Innovación ANII, Fondo María Viñas, 2011; ANII, programa Alianza 2014; Espacio Interdisciplinario EI UdelaR; CSIC programa VUSP Vinculación Universidad-Sociedad y Producción, 2018 y 2020.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Introducción

La Leptospirosis es una zoonosis con distribución mundial causada por cepas patogénicas del género *Leptospira*. Se estima que ocurren más de 1 millón de casos anuales de esta enfermedad en seres humanos, y que es responsable de casi 60.000 muertes por año. Sin embargo, se piensa que hay a nivel global un subregistro de los casos debido sobre todo a que la enfermedad es confundida con otras patologías principalmente febriles. No se dispone de un sistema de registro unificado y adecuado, y hay en general acceso limitado a pruebas de laboratorio confiables y aplicables en los diferentes niveles de atención para confirmar la infección (Reller ME et al, 2014).

En general se presenta de forma endémica aunque pueden ocurrir brotes epidémicos vinculados a inundaciones, otros desastres naturales, eventos masivos donde se practican deportes de aventura o excursiones y turismo a lugares exóticos (Vanasco NB et al, 2005), (Munoz-Zanzi C y col, 2020), (Morgan J et al, 2002), (Céspedes M y col, 2009).

La mayoría de los casos se dan en poblaciones vulnerables, expuestas a diferentes factores de riesgo ambientales como habitar en zonas inundables, sin acceso al agua potable, sin adecuado tratamiento de las aguas residuales, con personas en situación de calle y en contacto estrecho con animales domésticos o silvestres (Costa F et al, 2015).

La Leptospirosis también integra el grupo de las enfermedades **ocupacionales**, ítem 1.3.8, entendidas como aquellas causadas por agentes físicos, químicos o biológicos (en este caso una bacteria) utilizados o manipulados durante la actividad laboral o que estén presentes en el lugar de trabajo. (<https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/210-2011>). Los trabajadores expuestos a leptospiras incluyen tamberos, peones rurales, cultivadores de arroz, veterinarios, personal de faena, recicladores de neumáticos y de residuos, personal que realiza el mantenimiento del sistema de saneamiento, personal de laboratorio, entre otros.

Está ubicada dentro del grupo B de las enfermedades y eventos sanitarios de notificación obligatoria y tiene el CIE A27. (<https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/guia-nacional-vigilancia-control-enfermedades-eventos-sanitarios>).

Las leptospiras patogénicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Afectan a los seres humanos y a una variedad de animales domésticos destinados a compañía, a la producción de alimentos (cárnica y láctea, etc.) e infectan también una gran variedad de animales silvestres y peridomésticos presentes en nuestro medio como roedores, jabalíes, mulitas, o en ambiente marino: poiquiloterms, mamíferos diversos. Cepas patogénicas de *Leptospira* también se recuperaron de sapos y ranas y algunos autores sugieren que estos animales participan en la diseminación de estas bacterias en el ambiente. (Haake DA & Levett PN, 2015).

La sobrevivencia de *Leptospira* en el agua y suelo depende de factores tales como pH, temperatura, presencia de otras bacterias competidoras, entre otros. En general se mantienen viables a pH cercano a 7, y son inactivadas en ambientes ácidos o alcalinos. Pueden permanecer activas e infectivas en los espejos de agua dulce por períodos prolongados y no toleran por mucho tiempo en el agua salada. Sin embargo, hay cepas halotolerantes, saprofitas y patogénicas que pueden favorecer la infección de poiquiloterms y mamíferos marinos (Grüne Löffler S et al, 2015).

La patología de muchos animales de producción y las pérdidas económicas que conlleva han sido por mucho tiempo los principales incentivos para el estudio en nuestro medio de esta zoonosis, pero la enfermedad humana ocasiona igualmente daños relevantes que requieren atención.

Los seres humanos son considerados **huéspedes accidentales/incidentales**, que no transmiten el agente por contacto directo a otros seres humanos. Hay sin embargo algunos casos publicados hace décadas, de posible transmisión interhumana vertical transplacentaria, durante la lactancia o por contacto sexual (Harrison NA & Fitzgerald WR, 1988).

Por otra parte la mayoría de los animales actúan como huéspedes **o anfitriones de mantenimiento o**

reservorio de alguna variante. En éstos la infección es endémica, propagando el agente fácilmente a otros animales de la misma u otra especie a través de contacto directo o indirecto por agua o suelo contaminado con orina (**figura 1**). Debido a que adquieren la infección siendo muy jóvenes, la prevalencia de eliminación crónica por la orina es alta, hecho que favorece su diseminación a otros animales susceptibles o a los seres humanos. (Bharti AR et al, 2003).

Los animales pueden actuar como **anfitriones de mantenimiento** para algunos serovares y como huéspedes accidentales para otros; en este último caso el resultado de la relación es más violenta que con los hospederos de mantenimiento. **Los anfitriones de mantenimiento más universalmente reconocidos son los pequeños mamíferos**, incluyendo roedores diversos: ratas, ratones, apereás, nutrias, etc. (Ricardo T et al, 2020). Las ratas en general son portadoras de cepas del serogrupo Icterohaemorrhagiae, los ratones de Ballum; el ganado bovino suele serlo de los serovares Hardjo, o de Kennewicki en algunas regiones, los cerdos de Kennewicki, Tarassovi o Bratislava, y los perros de Canicola. Existen variaciones a nivel mundial en estas asociaciones entre serovares y huéspedes de mantenimiento, y ellas pueden modificarse en el tiempo. Las leptospiras se ubican en gran número a nivel de los túbulos proximales renales de estos animales, que las eliminan por períodos prolongados sin sufrir efectos perjudiciales importantes. Ellos constituyen el reservorio más importante del agente, y algunos autores indican que la relación entre ambos es de tipo **comensal** (Bharti AR et al, 2003).

El ciclo básico de circulación de *Leptospira* es el siguiente: eliminación por la orina por parte del huésped **de mantenimiento**, persistencia en el ambiente, contacto directo o indirecto con otro **hospedero (de mantenimiento o incidental)**, ingreso a éste por diferentes puertas de entrada (heridas de piel, mucosas sanas, etc.), desarrollo de leptospiremia con diseminación a los **riñones**, colonización de la luz y las células de los **túbulos renales proximales**, y nuevamente **eliminación urinaria al exterior** por períodos prolongados, con escasa o nula sintomatología en el caso de los huéspedes **de mantenimiento**. Los seres humanos se integran a este ciclo de forma accidental, por contacto directo o indirecto con la orina de estos animales y como vimos más arriba **no constituyen huéspedes de mantenimiento (figura 1)** (Bharti AR et al, 2003).

Las leptospiras ingresan a los **seres humanos** a través de pequeñas heridas o abrasiones de la piel o de superficies mucosas intactas como la conjuntival. No ocurren manifestaciones evidentes a nivel de la puerta de entrada como sucede en las infecciones por otras espiroquetas como *Treponema pallidum* o *Borrelia burgdorferi*, a excepción de la característica hiperhemia conjuntival ("**ojo rojo**").

Los **animales criados en diferentes explotaciones productivas** (ganado vacuno, cerdos, equinos, etc.) tienen ciclos endémicos de infección por distintos serovares a los que están más o menos adaptados. Sin embargo, animales silvestres u otros animales de producción infectados pueden ingresar a los establecimientos aportando serovares que producen interacciones más violentas (Haake DA & Levett PN, 2015).

Por todo esto que vimos, el entendimiento de la epidemiología y otros aspectos básicos de la Leptospirosis requieren de una visión amplia que incluya la participación de un equipo multidisciplinario integrado por veterinarios, médicos, biólogos, zoólogos, asistentes sociales, sanitaristas, ecólogos, climatólogos, etc. destacando la importancia de su encare desde el punto de vista de **Una Salud** (Haake DA & Levett PN, 2015).

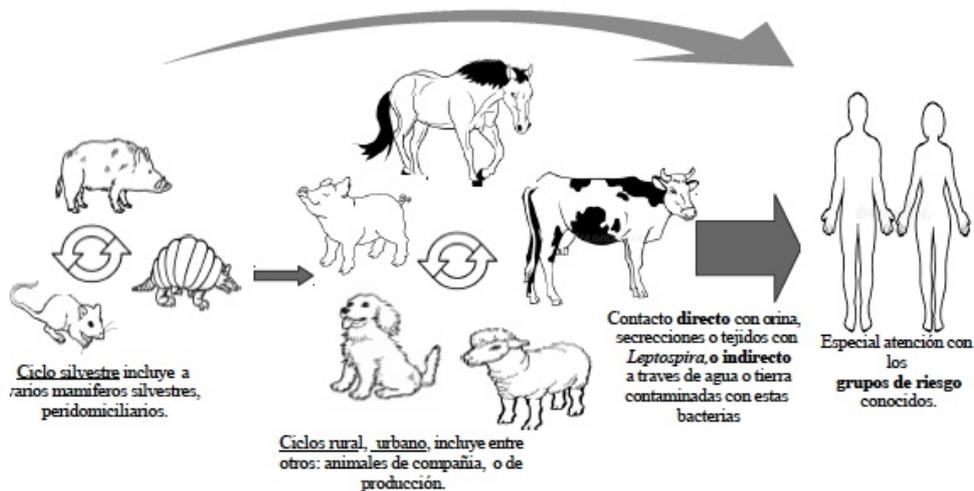


Figura 1. Ciclos que muestran algunos huéspedes de mantenimiento o accidentales de *Leptospira* (animales silvestres o domesticados) y a los seres humanos como anfitriones accidentales.

El agente

El género *Leptospira*, compuesto por cepas altamente variables, pertenece a la familia *Leptospiraceae* que incluye además los géneros *Leptonema* y *Turneriella*.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=170&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>).

Se trata de bacterias delgadas de tamaño variable (diámetro 0.1 μm , rango de longitud 6–20 μm), con forma espiralada, muy móviles, capaces de pasar filtros de poro 0,22 μm , y con un movimiento típico debido a la acción de los flagelos periplásmicos (**figuras 2 y 3**). No se tiñen con las coloraciones bacteriológicas clásicas y se observan muy bien con el microscopio de campo oscuro. Son aerobias, de crecimiento lento, con temperatura óptima entre 28-30°, y requerimientos nutritivos especiales. Pueden sobrevivir días a meses en ambientes húmedos, si no están expuestas a pH o presiones osmóticas extremas. Tienen una estructura similar a la de las bacterias Gram negativas, y al igual que éstas en la cara exterior de la membrana externa tienen localizadas las moléculas de lipopolisacárido (LPS). Las diferencias químicas y estructurales que existen entre los diferentes LPS constituyen la base para la clasificación de *Leptospira* en serovares y serogrupos (Levett PN, 2015).

Son clasificables en más de **300 serovares** (definidos de acuerdo a los resultados de pruebas clásicas de micro-aglutinación con sueros anti-LPS absorbidos) y en cerca de 40 genoespecies por estudio de su ADN, más de la mitad de ellas con cepas plena o parcialmente patógenas (Thibeaux R et al, 2018); (Guglielmini J et al, 2019).

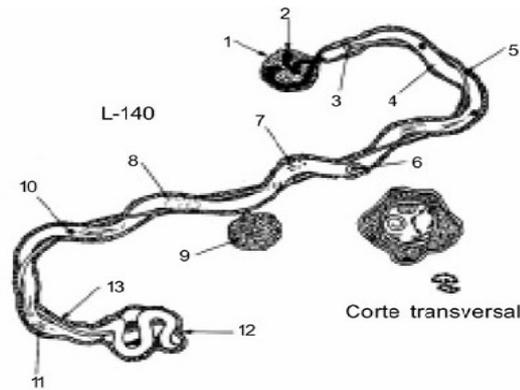


Figura 2. Esquema ultraestructural de *Leptospira*: Formación terminal (1), apéndices terminales (2), gránulo basal (3), cilindro citoplasmático (4), filamentos axiales (5), estructura lamelar (6), inclusiones electrondensas (7 y 10), inclusiones electrondifusas (8), formaciones globosas (9), nucleoide-ADN (11), quiste (12) y membrana externa (13). Corte transversal en marco. Tomado de: De Katz KN, Ananhin, VV. *Leptospirosis humana y animal*. Moscú: Ed. Medicina; 1971.

Los serovares que están antigénicamente relacionados se ubican en el mismo serogrupo. Estos no tienen valor desde el punto de vista taxonómico, pero sin embargo se utilizan para referirse a las cepas de forma general como veremos más adelante.

Existe intercambio de genes involucrados en la síntesis de LPS entre cepas de *Leptospira* y esto explicaría por qué muchos serovares son compartidos por diferentes especies. De este modo, establecer de forma aislada el serovar de una cepa en estudio no permite conocer la especie que lo porta (Haake DA et al, 2004).

Lo recomendable es definir primero la especie y la serovariedad posible por métodos de biología molecular (ej. secuenciación parcial del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, MLVA-VNTR Multi Locus Variable-number tandem-repeat Analysis, o secuenciación completa del genoma) y luego determinar por técnicas clásicas de micro-aglutinación el serovar correspondiente. Esto requiere de gran cantidad de antisueros de compleja preparación, y por lo tanto este procedimiento está limitado únicamente a laboratorios de referencia a nivel mundial (Zarantonelli L et al, 2018).

Las especies de *Leptospira* se dividen en 3 grupos de acuerdo a su potencial patogénico y evolutivo: patógenas, intermedias y saprófitas, y son clasificables mediante MLST (Multi-Locus-Sequence-Typing) según presencia de diferentes genes *housekeeping*. Las especies patógenas son responsables de la mayoría de las enfermedades severas que ocurren en seres humanos y animales; las intermedias son ubicuas y causan enfermedades leves en ambos grupos de hospederos. Las especies definidas como saprófitas están bien adaptadas a la vida libre, ampliamente distribuidas en la naturaleza y raramente producen enfermedad (Fouts DE et al, 2016), (Thibeaux R et al, 2018).

La disponibilidad de herramientas de biología molecular, de bases de datos y de análisis bioinformáticos potentes llevó a rápidos y recientes cambios en la taxonomía de este agente, con la definición de genomoespecies y nuevos géneros dentro de *Leptospiraceae*, así como el desarrollo de nuevas metodologías que permiten la identificación, la caracterización por MLST, PFGE, secuenciación de los diferentes aislamientos de *Leptospira* y la valoración de su potencial patogénico (Picardeau M, 2017). Estas herramientas tienen además una evidente utilidad epidemiológica para el estudio de brotes, identificación de reservorios y diseño de vacunas.

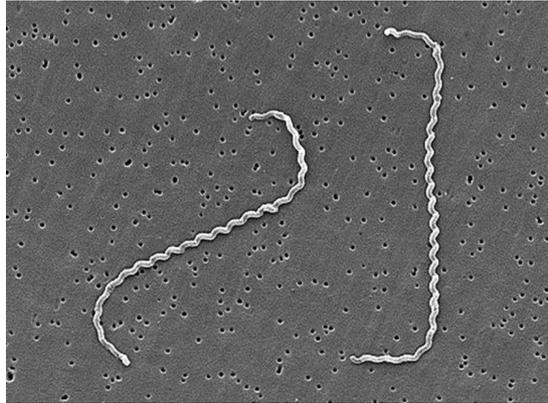


Figura 3. Microfotografía electrónica de barrido de la cepa RGA de *Leptospira interrogans* que muestra claramente los extremos en forma de gancho. **Tomado de:** Haake DA et al. (2015). Leptospirosis in humans. Pp 65-97 in: B. Adler (ed.) *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology 387. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Condiciones para su cultivo en el laboratorio, diferencias entre las de vida libre y las cepas patogénicas

Leptospira es capaz de sintetizar aminoácidos y ácidos nucleicos a partir de sus precursores básicos. Esto las diferencia de *B. burgdorferi* y *T. pallidum*, que los requieren preformados. Crecen bien en aerobiosis (FiO₂ entre 18-21%) y los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) constituyen su principal fuente de carbono. Sin embargo, a concentraciones elevadas los AGCL pueden tener un efecto inhibitorio sobre su crecimiento. Para superar esta situación se agrega a los medios de cultivo suero con albúmina o albúmina bovina purificada. Esta sustancia absorbe los ácidos grasos y los libera lentamente al medio, generando concentraciones no tóxicas para *Leptospira*. El agregado de TWEEN tiene un efecto similar. La temperatura óptima de crecimiento está entre 28 y 30°C, aunque las especies saprófitas, a diferencia de las patógenas e intermedias, se multiplican a temperaturas más bajas (11-14°C). El pH óptimo se ubica en el rango de la neutralidad (7.2-7.4). El tiempo de duplicación *in-vitro* de una cepa patogénica es de 16 horas y tienen un periodo de latencia (lag) de 1 a 3 semanas hasta el desarrollo de la fase exponencial (Cameron CE, 2015), (Zuerner RL, 2005), (Adler B, 2015).

Para el cultivo en el laboratorio existe una variedad de medios líquidos, semisólidos y sólidos, muchos de origen comercial y otros que se pueden preparar a partir de sus componentes básicos. Cada medio presenta ventajas y desventajas. Algunos tienen el agregado de inhibidores, utilizables cuando se procesan muestras contaminadas (ej. orina, muestras de agua, etc.). En estos casos además, se puede explotar el hecho de que debido a su tamaño, pueden atravesar filtros de 0.22 µm de poro, y filtrar estas muestras antes de sembrarlas. También hay disponibles medios de conservación para el almacenamiento prolongado de los cultivos de *Leptospira*.

Manifestaciones clínicas en seres humanos

Se trata de una enfermedad de severidad variable, casi siempre de **comienzo agudo**, habitualmente auto-limitada, con manifestaciones inespecíficas, que muchas veces se confunde con otros procesos febriles de causa viral o bacteriana, e incluso con algunas enfermedades no infecciosas. Clásicamente se divide en 2 fases: la primera coincide con la presencia de leptospiras en sangre (**fase de leptospiremia**), y la segunda con la **presencia de anticuerpos circulantes y etapa de leptospiruria** (de duración más breve que en los huéspedes de mantenimiento) (Haake DA & Levett PN, 2015), (Tarantola A & Goarant C, 2018) (**figura 4**).

Tiene un período de incubación variable de 5 a 15 días, llegando incluso a los 30 días. La duración de esta etapa depende de la carga del inóculo bacteriano, del estado de salud del hospedero y de la cepa infectante,

entre otros factores (Morgan J et al, 2002).

La mayoría de los pacientes desarrolla formas asintomáticas o con manifestaciones leves a nivel del tubo digestivo (dolor abdominal, vómitos o diarrea), tracto respiratorio (tos seca, no productiva), cefaleas, dolores musculares y articulares u orinas espumosas por proteinuria. Con frecuencia, los enfermos no requieren o buscan atención por parte del personal de salud (**esta situación claramente contribuye al subregistro de los casos**). Muchos presentan hiperemia conjuntival, signo casi patognomónico de la enfermedad; sin embargo su ausencia no permite descartar la infección por *Leptospira*. El rash cutáneo es raro y cuando aparece sugiere el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas (Dengue, Chikungunya, entre otras) (Zaki SA et al., 2010)

Entre un 5-10% de los pacientes puede desarrollar la forma icterica severa con compromiso de varios órganos, denominada **enfermedad de Weil**. Esta entidad tiene una letalidad cercana al 10%. Muchos de estos pacientes presentan un síndrome hemorrágico (equimosis, petequias o sangrados severos a nivel digestivo o pulmonar) (Wagenaar JF et al, 2010). Pueden desarrollar insuficiencia circulatoria (shock) acompañada por un síndrome de dificultad respiratoria severo (Breijo M y col, 2006), (Jayakrishnan B et al, 2013).

La infección grave por *Leptospira* también se asocia con el **síndrome de hemorragia pulmonar severa (SHPS)**, que puede ocurrir de forma aislada o como brotes y que en ocasiones se confunde con infección por Hantavirus (Yersin C et al, 2000).

Leptospira también es agente de complicaciones neurológicas como **meningitis aséptica** con LCR claro. En algunas zonas es el agente más frecuentemente asociado con esta patología (Silva HR et al, 2002).

Otros pacientes presentan en la etapa de recuperación (**con título elevado de anticuerpos circulantes**) compromiso ocular (uveítis), uni o bilateral, de severidad variable. Puede ser aguda y autolimitada o recurrente con episodios agudos repetidos en el tiempo (Verma A & Stevenson B, 2012).

Aunque la enfermedad se describe habitualmente como aguda y autolimitada, un porcentaje variable de los pacientes padece síntomas por meses o años luego de una infección aguda confirmada. Estas personas relatan dolores musculares que aparecen y desaparecen, fatiga crónica, cefaleas recurrentes, y desgano para desarrollar tareas de la vida cotidiana. No está claro si se trata de una infección crónica o trastornos de tipo autoinmune (Goris MG et al, 2013).

La infección por un serovar **no produce protección cruzada (inmunidad heteróloga)** contra la infección con otros serovares no relacionados, por lo tanto un paciente puede padecer otras infecciones, sintomáticas o no, luego de recuperarse.

Tratamiento con antibióticos

La mayoría de los pacientes con Leptospirosis se recuperan completamente, algunos incluso sin tratamiento con antibióticos.

Ha sido largamente discutida, en nuestro medio y a nivel global, la pertinencia del tratamiento antimicrobiano, por considerar que el componente principal del daño patológico era la intensa respuesta inmune y no la acción o la proliferación microbiana. Se reconoce actualmente que el inicio temprano del tratamiento antibiótico está claramente indicado, previene que muchos pacientes desarrollen formas severas de la enfermedad y que dejen de eliminar el agente por la orina rápidamente. Por estas razones, el tratamiento empírico debe iniciarse incluso antes de tener la confirmación laboratorial de la infección, basado en **aspectos clínicos y epidemiológicos**, sobre todo en aquellas personas que presentan **riesgo de padecer formas graves** de la enfermedad (**ver más adelante**) (Breijo M et al, 2006) (Haake DA & Levett PN, 2015).

Entre los antibióticos más usados están: **penicilina, ampicilina, y cefalosporinas de 3era. generación**, administrados por vía intramuscular o intravenosa para los pacientes que requieren hospitalización (Panaphut T y col, 2003).

Para el caso de sujetos adultos que reciben tratamiento ambulatorio, **doxiciclina y azitromicina** son alternativas utilizables. La doxiciclina se ha empleado como quimioprofilaxis en situación de brotes epidémicos (Katelaris AL et al, 2020) pero su eficacia e inocuidad han sido controvertidas. En niños y mujeres embarazadas se utiliza **amoxicilina**.

Factores asociados con desarrollo de síntomas severos y evolución desfavorable

El sexo masculino, la edad > 36 años, la presencia de insuficiencia respiratoria y la aparición de confusión mental en la etapa aguda de la enfermedad se han reportado como asociados con un aumento significativo de la letalidad (Pappachan MJ et al, 2004). La presencia de oliguria, hiperkalemia, estertores pulmonares o hipotensión al ingreso hospitalario se han señalado como indicadores de alto riesgo de muerte (Panaphut T et al, 2002).

Enfermedad en los animales

La infección de los animales está ampliamente distribuida y éstos constituyen el reservorio principal para los casos en los seres humanos (**figura 1**). Pueden sufrir infecciones agudas o crónicas. Ocurren tanto en animales salvajes como en los domesticados destinados a compañía, trabajo o producción de alimentos. Diferentes animales pueden actuar como **hospederos de mantenimiento** de distintos serovares, con infección crónica, sin presentar manifestaciones clínicas evidentes y con eliminación renal por períodos prolongados, o pueden infectarse con otros serovares de forma **accidental**. En general, estas últimas infecciones determinan enfermedades agudas de gravedad variable, que incluso pueden ocasionar la muerte del animal, y presentan excreción renal de duración limitada. Los animales se infectan a través de la mucosa oral, ocular, nasal o incluso por vía sexual. También ocurre transmisión vertical (placenta, leche). Luego de la etapa de bacteriemia las leptospiras se ubican en las células y en la luz de los túbulos contorneados proximales y son eliminadas al exterior por la orina, cerrando así el ciclo de transmisión. La eliminación puede ser permanente o periódica y puede durar toda la vida del animal. Estas bacterias también pueden persistir por períodos prolongados en el oviducto, el útero, las glándulas mamarias de las hembras y en el tracto genital de los machos. También ocurren infecciones crónicas a nivel ocular, sobre todo en equinos (Faine S et al, 2000) (Pettrakovsky J et al, 2014)

El **ganado vacuno** es huésped de mantenimiento de cepas del serovar Hardjo incluyendo los 2 subtipos, Hardjobovis y Hardjoprajitno. Ambos subtipos tienen la capacidad para persistir por períodos prolongados en el tracto genital de vacas y toros, pudiendo transmitirse por contacto sexual (Loureiro AP, Lilenbaum W, 2020). Las cepas del serovar Kennewicki se encuentran frecuentemente en condición de mantenimiento o accidental en rodeos del continente americano. Los bovinos también pueden infectarse de forma incidental con cultivos pertenecientes a los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica, Tarassovi, Grippytyphosa u otros. Varios de ellos se asocian con enfermedades severas, sobre todo en animales jóvenes, y en hembras preñadas causando “tormentas de abortos” (Lilenbaum W, Martins G, 2014).

En cambio, la infección aguda con cepas del serovar Hardjo tiene generalmente manifestaciones clínicas más leves; en vacas de leche se asocia a disminución de la producción y presencia de sangre en la leche. También se vincula con abortos tardíos que ocurren 6 a 12 semanas luego de la infección, partos prematuros y terneros de bajo peso (Pettrakovsky J et al, 2014).

La Leptospirosis es común en **cerdos**. Estos animales pueden ser huéspedes de mantenimiento de una variedad de serogrupos entre los que se encuentran Australis, Pomona y Tarassovi, y además pueden ser anfitriones incidentales de cepas de los serogrupos Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae u otros. Las formas severas de la enfermedad se ven en los animales más jóvenes; en cambio los machos adultos padecen formas leves, incluso asintomáticas y pueden eliminar leptospiras con la orina por años (Haake DA & Levett PN, 2015), (Caffarena RM y cols 1966).

Los **caballos** se infectan de forma incidental con un amplio rango de serovares (Pinto PS y cols, 2017), (Divers TJ et al, 2019).

Esta infección tiene un impacto negativo en el agronegocio equino, principalmente por las pérdidas debidas a abortos, mortinatos, y además produce menor desempeño atlético en los caballos de carrera por la infección subclínica (Hamond C y col, 2012).

A pesar que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, en los casos con sintomatología las manifestaciones clínicas en los equinos son similares a las observadas en otros animales, como el ganado

bovino. La forma más leve de presentación de la enfermedad es un cuadro con fiebre, apatía y anorexia. En las formas más graves puede darse sufusión conjuntival, ictericia, anemia y hemorragias petequiales en la mucosa. En potros puede ocurrir insuficiencia renal e ictericia o falla respiratoria aguda, las cuales son raras en caballos adultos (Timoney JF y col, 2011). Puede afectar la reproducción produciendo abortos, mortalidad perinatal y potros prematuros (Jaeger LH et al, 2019),(Hamond C y col, 2015),(Siqueira CC y col, 2020). Los abortos por Leptospirosis ocurren en la última etapa de la gestación, generalmente sin ningún síntoma clínico previo. Luego de la infección aguda, algunos animales pueden desarrollar uveítis recurrente, llegando incluso a la pérdida de la visión. Esta patología se atribuye a fenómenos auto-inmunes e infección crónica a nivel del humor vítreo. Ocurre meses o años luego de la infección pudiendo ser uni o bilateral (Braga J et al, 2011), (Fischer BM y col, 2019),(Hartskeerl RA y col, 2004). En la fase inicial se manifiesta con miosis, blefaroespasmos, fotofobia, lagrimeo y ocasionalmente queratitis. En infecciones crónicas puede aparecer corioretinitis, cataratas, decoloración del cristalino, alteración del color del iris, sinequia y glaucoma.

Los **perros** son **huéspedes de mantenimiento** de cepas del serovar Canicola u otros y sufren **infecciones incidentales** por cultivos del serogrupo Icterohaemorrhagiae u otros. La mayoría de las infecciones son leves aunque pueden presentar formas severas con compromiso pulmonar acompañadas o no de ictericia. Al igual que ocurre con los caballos, algunos perros pueden desarrollar uveítis recurrente con pérdida de la visión. La Leptospirosis canina, su prevención por vacunación y el eventual riesgo para los responsables o personas próximas es preocupación frecuente de los veterinarios urbanos dedicados a pequeños animales en nuestro país, pero no es igualmente atendida en ambientes rurales o en actividades económicas informales vinculadas a ecosistemas variados (Miraglia F y col, 2012) (Bertasio C y col, 2020) (Suepaul SM y col, 2010).

Los **roedores** en general, pero fundamentalmente la **rata marrón** *Rattus norvegicus*, son huéspedes de mantenimiento de cepas de los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni. Otras especies, que habitan zonas rurales o de bosques, pueden ser portadoras de cepas de los serogrupos Autumnalis, Ballum, Canicola y Grippotyphosa. Los roedores son considerados **portadores universales** de *Leptospira* y muchos casos de la enfermedad en seres humanos y otros animales están asociados al contacto directo o indirecto con la orina de estos (Boey K et al, 2019) (de Faria MT y col, 2008) (Agudelo-Flórez P et al, 2009), aunque no siempre se reconocen como el reservorio principal de estas infecciones (Biscornet L et al, 2017) (Loan HK et al, 2015).

Existe otro conjunto importante de animales, sobre todo mamíferos aunque también se han encontrado reptiles, batracios, y peces (Mgode GF et al, 2014) que participan del ciclo de la Leptospirosis; sin embargo, no serán tratados aquí.

Prevención

Las medidas de prevención están basadas sobre todo en el conocimiento del amplio reservorio, de la epidemiología y de los mecanismos de transmisión de *Leptospira*. Existen grupos de personas que tienen un riesgo mayor de entrar en contacto con el agente, infectarse y desarrollar la enfermedad. Las medidas que evitan el contacto de *Leptospira* con la piel y mucosas de las personas expuestas (lentes de seguridad, botas de goma, guantes, ropa de trabajo adecuada, entre otras) son efectivas y ampliamente utilizadas. La construcción de viviendas dignas, en zonas seguras no inundables, con acceso al agua potable y disposición final segura de las aguas servidas, el control de roedores, y los programas de educación sobre el agente la enfermedad y su transmisión son medidas de control eficaces **aplicables a todos los serovares**.

La identificación y reducción de la carga infecciosa de los reservorios animales como los de compañía, trabajo o producción a través de la identificación y tratamiento de los individuos infectados, y del uso de **vacunas**, son estrategias fundamentales en los programas de control de la enfermedad.

Para esto se requiere el conocimiento previo de los serovares o serogrupos prevalentes, ya que como vimos antes, las vacunas son eficaces contra los serovares que la integran.

En Uruguay existen vacunas comerciales preparadas con leptospiras **enteras inactivadas (bacterinas)** de varios serovares, que se utilizan en bovinos, cerdos, canes y ocasionalmente en otros animales.

BIOLEPTOGEN® para uso en cerdos y vacunos contiene una suspensión acuosa de los serovares Canicola Canicola, Icterohaemorrhagiae Copenhageni, Grippotyphosa Grippotyphosa, Pomona Pomona, Sejroe

Hardjo, Australis Bratislava y Tarassovi Tarassovi de *Leptospira interrogans*. PROVIDEAN® LEPTO 8 contiene *Leptospira interrogans* serovares Pomona, Canicola, Hardjo, Wolffii, Bratislava e Icterohaemorrhagiae; *Leptospira borgpetersenii* serovar Tarassovi y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. (Adler B, 2015).

VAC-SULES LEPTO 11® de Microsules contiene suspensiones de los serovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Copenhageni, Pomona, Wolffii, Grippotyphosa, Tarassovi, Hardjo, Pyrogenes, Bataviae y Hardjo bovis; incluye adyuvante oleoso y conservante timerosal.

Bovisan Lepto 8® de Virbac contiene suspensión inactivada de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo tipo Hardjo-prajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffii, *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo-bovis, hidróxido de aluminio 10% y timerosal como conservante.

Existen 5 **vacunas licenciadas para uso en seres humanos**. La de **origen cubano**, vax-SPIRAL®, fue desarrollada en el Instituto Finlay y contiene 3 serovares, Canicola, Copenhageni y Mozdok. La **francesa**, monovalente, producida por Sanofi-Pasteur® incluye cepas del serogrupo Icterohemorrhagiae. La **japonesa** incluye cepas de los serovares Australis, Autumnalis, Hebdomadis y Copenhageni. La de origen **Chino**, producida en el Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd es la que contiene el mayor número de serovares: Lai, Linhai, Autumnalis, Canicola, Pomona, Australis, Hebdomadis y Australis. Estas 4 vacunas están constituidas por cepas inactivadas. La quinta, desarrollada también en China por el Institute of Biological Products Co., Ltd. está formada por antígenos de la envoltura externa de cepas de los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Hebdomadis (Xu Y, et al., 2018). **La vacunación con estos productos no es de uso general obligatorio**: está recomendada para aplicar en personas con riesgo laboral o de forma más amplia en situaciones epidémicas particulares, inundaciones, terremotos, brotes extensos, etc. Al igual que ocurre con la infección natural, la protección que confieren estas vacunas es específica contra los serovares que las componen o aquellos muy relacionados antigénicamente (**inmunidad homóloga**) (Xu Y, et al., 2018).

Conocimientos sobre Leptospirosis en el personal de Salud humana y animal

En Uruguay, el conocimiento en general sobre esta zoonosis, su epidemiología, su manejo, tratamiento y prevención está poco difundido entre el personal de Salud y sus distintos técnicos, constituyendo un deber pendiente de la Facultad de Medicina, de la UdelaR y del propio Sistema de Salud. La autoridad sanitaria no considera prioritaria la investigación que permita el avance del conocimiento en el tema.

Médicos y veterinarios cuentan con un conocimiento general correcto sobre distintos aspectos de esta afección. Sin embargo, respecto a las variables reservorio y transmisión de la enfermedad, la información con que cuentan los médicos es incompleta: consideran en general de modo restringido a la población de ratas como único componente de riesgo del reservorio animal, y no identifican precisamente la orina animal y líquidos contaminados con ella como fuente principal de infección.

En actividades de difusión y extensión con intención preventiva, es habitualmente amplia la participación de trabajadores, productores rurales, docentes, veterinarios y pobladores en general, pero muy reducida o nula la intervención del personal de salud humana.

En situación de práctica profesional, no es frecuente que se considere la Leptospirosis como un posible diagnóstico, aún en poblaciones de riesgo y frente a cuadros clínicos compatibles, y no está suficientemente difundida la disponibilidad del diagnóstico de laboratorio, aunque se ha avanzado bastante en ello.

Impactos

Los años de vida perdidos por discapacidad (DALY por sus siglas en inglés -Disability Adjusted Life Years) es un indicador utilizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el grupo de Estudio de la Carga Mundial de Enfermedades para estimar el impacto de una enfermedad. Un DALY equivale a un año de vida saludable perdido. Este indicador permite la comparación directa entre problemas de salud pública, en términos comunes que reflejan principalmente el impacto en la capacidad productiva económica de un grupo humano.

Los DALY son el resultado de la suma del número de años de vida perdidos debido a la mortalidad (AVP) y el número de años vividos con una discapacidad (AVD) debido a la enfermedad.

La carga mundial por Leptospirosis se estima en 2,9 millones de DALYs al año. Esto consiste en 2,8 millones AVP y 103.200 AVD.

El impacto de la Leptospirosis es mayor en poblaciones pobres sin las necesidades básicas satisfechas, incluyendo África, América central y del Sur (Torgerson PR et al, 2015).

Diagnóstico de laboratorio

Existen diferentes procedimientos de laboratorio que permiten confirmar la infección por *Leptospira*. Se pueden agrupar de forma clásica en **métodos indirectos** (aquellos que ponen de manifiesto la respuesta inmune al agente) o **directos** que permiten la recuperación del agente o detectan la presencia de su genoma u otras moléculas que lo integran. Durante mucho tiempo, el **diagnóstico etiológico** se realizó demostrando la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en el suero de los pacientes, utilizando diferentes técnicas como reacciones de aglutinación, ELISA, inmunofluorescencia, tests inmunocromatográficos para la detección de IgM e IgG o la técnica clásica de micro-aglutinación **MAT** por su nombre en inglés (**Micro Agglutination Technique**) (Haake DA, Levett PN, 2015).

En la prueba de MAT el suero de los pacientes se enfrenta con un panel de 15-20 leptospiras vivas correspondiente a diferentes serovares. La MAT pone de manifiesto anticuerpos aglutinantes **serogrupo-específicos** y no permite definir el serovar infectante cuando se analizan muestras tempranas (**figura 4**) (Murray CK y col, 2011). Atendiendo a las distintas etapas de la historia natural de la infección (**figura 4**), un resultado negativo por MAT en los primeros días de la enfermedad, cuando el nivel de anticuerpos es bajo, no descarta la infección por *Leptospira*.

Para la confirmación de una **infección aguda** (sintomática o no) se requiere el estudio por MAT de 2 sueros consecutivos (uno de fase aguda y otro de fase convaleciente, incluso a veces en caso de dudas se analiza una 3era. muestra) porque el ascenso de los títulos de anticuerpos revelables por MAT no es inmediato. Por lo tanto, en muchos casos el diagnóstico por este procedimiento es retrospectivo.

El mantenimiento de las cepas del panel, la necesidad de un microscopio de campo oscuro para la lectura de las micro-aglutinaciones y de contar con personal entrenado en la interpretación de los resultados, determinan que esta técnica no esté disponible en todos los laboratorios de microbiología.

Sin embargo, debido a su plasticidad para modificar el panel de serovares ensayados, a que permite realizar el diagnóstico de infección en distintos animales, a su utilidad en los estudios seroepidemiológicos, la MAT es la **técnica de referencia estándar** contra la cual se comparan los otros procedimientos de diagnóstico (Haake DA, Levett PN, 2015).

Como alternativa se han desarrollado y aplicado diferentes ensayos de tamizaje más simples, basados como en el caso de la MAT, en reacciones antígeno-anticuerpo. Muchos son de origen comercial y otros son preparados localmente. Los anticuerpos de tipo IgM aparecen temprano en la evolución de la infección (**ver figura 4**), por lo tanto su determinación por ELISA, por ensayos de aglutinación, tests inmunocromatográficos o IFI se aplica al diagnóstico temprano, analizando una sola muestra de suero. Los principales inconvenientes que tienen estos procedimientos son: la adecuación de los antígenos usados (**la prevalencia de los distintos serovares varía según la región o zona analizada, por lo tanto no hay antígenos universales**), la presencia frecuente de IgM por un tiempo prolongado más allá de la etapa aguda, la infraestructura de laboratorio necesaria para ELISA e IFI y el número de reacciones cruzadas que pueden tener con otros agentes infecciosos.

La **inmunofluorescencia indirecta** (IFI) es una técnica rápida, de ejecución e interpretación relativamente fáciles cuando se compara con la MAT, y no requiere trabajar con bacterias vivas en la etapa de ejecución del procedimiento y lectura de los resultados. La IFI permite, además, diferenciar la presencia de anticuerpos de tipo IgM presentes principalmente en las primeras etapas de la infección, o tipo IgG indicador de infecciones pasadas. Tiene el inconveniente de que se precisa un microscopio de luz UV para la lectura de los resultados, y técnicos experimentados en la misma (Aricapa HJ y col, 2008), (Meny P et al, 2014).

Los tests comerciales inmunocromatográficos (IC) o de dot-blot permiten la detección en forma sencilla y rápida de anticuerpos de tipo IgM o IgG (Haake DA, Levett PN, 2015) pero estos tests tienen limitaciones para el diagnóstico temprano de la infección, por lo cual en caso de resultados positivos y sobre todo negativos, es recomendable confirmar los mismos por MAT sobre la misma muestra o una solicitada días después.

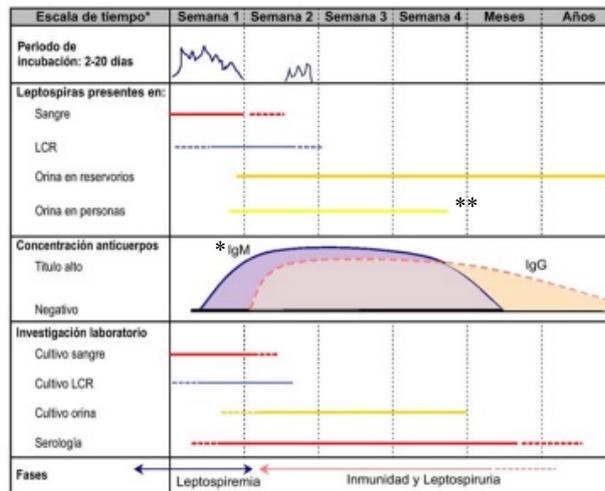


Figura 4. Historia natural de la infección por *Leptospira*. Tomada de: Céspedes Z, Manuel. (2005). Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 22 (4), 290-307.

* Los anticuerpos de tipo IgM pueden durar varios meses después de una infección aguda.

** La etapa de leptospiruria es notoriamente más breve en los seres humanos.

Métodos directos

Aislamiento e identificación de *Leptospira*

Las leptospiras en general y las asociadas con enfermedad en seres humanos y animales en particular, son difíciles de cultivar en el laboratorio. Requieren la utilización de medios de cultivo especiales con agregado de factores de crecimiento, agentes detoxificantes, temperaturas de incubación de 28-30° C y periodos de incubación prolongados (hasta 12 semanas o más para descartar un cultivo como negativo). Las leptospiras pueden ser recuperadas a partir de muestras de sangre obtenidas en las primeras etapas de la infección (**fase leptospirémica**) (ver figura 4). Un par de gotas de sangre obtenida por punción venosa se pueden sembrar directamente a “los pies de la cama” del paciente en medios apropiados para *Leptospira* como el EMJH (medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) o colocar un volumen adecuado de sangre en tubos estériles con los anticoagulantes recomendados y enviarlos rápidamente, a temperatura ambiente a un laboratorio de referencia. Si el hemocultivo se siembra por error en los medios de rutina, se pueden enviar los frascos al laboratorio de Leptospirosis, para resembrar en medios apropiados.

Otras muestras a partir de las cuales se pueden recuperar leptospiras incluyen orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), o más raramente líquido peritoneal, humor acuoso. Medios de cultivo líquidos o semisólidos con el agregado de inhibidores como el EMJH-5FU (medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris con 5-fluoruracilo) son útiles para inocular con muestras en las que se sospecha contaminación por otras bacterias de crecimiento rápido.

Si bien desde el punto de vista clínico individual no merece la pena tanto esfuerzo ya que la demora que requiere el cultivo no modifica la conducta terapéutica, desde el punto de vista epidemiológico, la recuperación de las cepas infectantes tiene un enorme valor ya que permite su caracterización completa, la comparación fenotípica y genotípica de aislamientos de orígenes diferentes, estudios de susceptibilidad a los antibióticos, ensayos de virulencia en modelos animales, selección de cultivos para el diseño de nuevas vacunas e inclusión de nuevas cepas circulantes en el panel MAT, en ELISA o en IFI para diagnóstico serológico.

Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (AAN)

Numerosos ensayos de AAN han sido aplicados para el diagnóstico de las infecciones por *Leptospira*. Las muestras utilizadas incluyen sangre, orina, LCR, humor acuoso y también secciones de diferentes órganos o tejidos obtenidos “post mortem”. Los ensayos AAN se clasifican de acuerdo al “blanco” que amplifican en 2

categorías: de **género**, aquellos que amplifican genes que están presentes en las cepas saprófitas y las patogénicas; y los que permiten identificar los cultivos **patogénicos** y que tienen como “blanco” de amplificación los genes de virulencia *LipL32* o *lfb1*, entre otros. Procedimientos de este tipo fueron evaluados en Tailandia (Thaipadunpanit J y cols, 2011). Estos autores confirmaron hallazgos previos sobre su utilidad para el diagnóstico temprano a partir de muestras de sangre en período leptospirémico, métodos incluso más sensibles que el hemocultivo, pero **sin embargo la MAT realizada en muestras de suero tomadas posteriormente detectó más casos**. Por lo tanto un resultado negativo por ANN en muestras obtenidas tempranamente no descarta la infección por *Leptospira*. Una limitación importante de estos ensayos convencionales de AAN es que no permiten identificar el serovar infectante.

La utilización de procedimientos de secuenciación completa del genoma sí permitiría la determinación de la especie y el serovar infectante. Sin embargo los resultados de estos ensayos deben interpretarse con cautela.

Caracterización de los aislamientos de *Leptospira*

Técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo. Para establecer de forma definitiva el serovar de los cultivos en estudio se requiere la utilización de una gran cantidad de sueros hiperinmunes policlonales obtenidos en conejos. Este procedimiento de MAT inversa, sumamente laborioso, denominado CAAT por su nombre en inglés (cross-agglutination absorption test), es el reconocido como el “patrón de oro” y solo se realiza en algunos laboratorios de referencia (Mgode GF y col, 2015). Otras técnicas de aglutinación que utilizan anticuerpos monoclonales permiten la serotipificación de forma rápida. Sin embargo, los resultados deben interpretarse con cuidado ya que estos anticuerpos reconocen pequeños epitopos presentes en el LPS que pueden ser compartidos por varios serovares. KIT Biomedical Centre, Leptospirosis Reference Centre: Typing with monoclonal antibodies. <http://www.kit.nl/biomedical-research/Leptospirosis-reference-centre>.

Técnicas de “huella dactilar” (*fingerprinting*) basadas en reacciones de AAN y en digestión de ADN

Existe una variedad de procedimientos basados en tecnología del ADN que permiten caracterizar y comparar aislamientos de *Leptospira*. En nuestro laboratorio hemos aplicado las técnicas clásicas de Multi Locus Variable number tandem-repeat Analysis, (MLVA), MultiLocus Sequence Typing (MLST) y RAPD PCR (Amplificación al azar de ADN polimórfico). También utilizamos el ensayo de electroforesis en campos pulsados (PFGE) por su nombre en inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

La PFGE consiste en la digestión del ADN cromosómico con una o varias enzimas de restricción y luego la separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa sometidos a un campo eléctrico pulsante con orientaciones alternantes. Se obtienen patrones de bandas de buena definición, que luego de la tinción con bromuro de etidio, son fotografiados y comparados utilizando el programa BioNumerics® (Galloway RL et al, 2010) (Loureiro AP et al, 2020).

Para el caso de MLVA se utilizan varios pares de cebadores para amplificar y determinar el número de repeticiones presentes en loci diferentes, que permiten caracterizar cepas de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaün L y col, 2006).

En la técnica de RAPD-PCR se realiza una amplificación “al azar” utilizando temperaturas de hibridación muy permisivas y cebadores inespecíficos pequeños, de unos 10 nucleótidos y de uno o varios tipos moleculares diferentes, que se unen a distintas secuencias blanco y generan amplicones de distintos tamaños, característicos de diferentes variantes microbianas (García-González R y col, 2019).

En el ensayo de MLST se amplifican fragmentos internos de 7 genes “house-keeping” (*glmU*, *pntA*, *pfkB*, *caiB*, *mreA*, *sucA* y *tpiA*) que luego son secuenciados. Las secuencias obtenidas se comparan con secuencias conocidas para determinar el perfil alélico y el secuenciotipo de la cepa en estudio (Ahmed N et al, 2006). El procedimiento ha evolucionado en combinación con técnicas de secuenciación genómica completa (Grillová L, Picardeau M, 2020).

Más ampliamente, **las técnicas de secuenciación comparativa** de ciertos genes (*rrs*, *secY*) o del genoma completo permiten la identificación de los aislamientos y su clasificación en estudios de epidemiología molecular de la Leptospirosis humana o animal (Soares PM et al, 2019).

Recientemente hemos incluido el estudio del genoma completo. Este procedimiento requiere el uso de herramientas de bioinformática para el ensamblaje y análisis de los genomas. Actualmente, integrantes jóvenes de laboratorio están adquiriendo destrezas y experiencia en este tema. Una limitante importante es que se necesitan equipos complejos e insumos caros. Por el momento la secuenciación completa de los genomas de *Leptospira* se hizo contratando y pagando servicios en el exterior o por colaboración con otros laboratorios.

Objetivo

El **objetivo general** de este trabajo referido a *Leptospira* y Leptospirosis es comunicar los resultados del estudio realizado durante 20 años por nuestro equipo multidisciplinario sobre una enfermedad y un agente poco atendidos por el personal de salud humana, sobre el amplio reservorio animal que alberga estos gérmenes, y transmitir conocimientos obtenidos con el enfoque “**Una Salud**” sobre la vinculación entre ambos campos de difusión de estas infecciones, con el fin de optimizar orientaciones sobre su manejo, prevención y control.

Nuestros propósitos iniciales de trabajo fueron acercar al laboratorio de Microbiología médica los procedimientos necesarios para practicar el diagnóstico de Leptospirosis humana y avanzar en el conocimiento clínico-epidemiológico de esta afección en el país, en sintonía con la iniciativa de colegas del Interior involucrados en el manejo de pacientes infectados (Filippini M y col, 2003).

Los **objetivos concretos o específicos** de nuestro primer proyecto de investigación fueron:

Estimar la incidencia de la infección por *Leptospira* en seres humanos, determinar aspectos de la epidemiología local y conocer los síntomas y signos presentes en la población local infectada.

Establecer el valor de la inmunofluorescencia indirecta por comparación con la MAT para anticuerpos totales como herramienta para el diagnóstico de la infección humana por *Leptospira*.

Trasladar los conocimientos adquiridos a pobladores de distintas zonas del país, referentes sociales, profesionales, técnicos y autoridades sanitarias en el territorio, para promover la prevención, el alerta precoz y el control de la Leptospirosis humana.

En sucesivos proyectos complementarios nos propusimos:

Evaluar la utilidad de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta “hecho en casa” para detectar anticuerpos IgM (IFI-IgM) en su aplicación al diagnóstico temprano de Leptospirosis.

Determinar la aplicabilidad en el diagnóstico rápido de infección por *Leptospira* de un test inmunocromatográfico comercial que detecta anticuerpos IgM e IgG.

Establecer el comportamiento de un ensayo de q-PCR (PCR en tiempo real) con SYBR-green en muestras de sangre para el diagnóstico temprano de leptospirosis humana.

Reconociendo retrasos metodológicos en el aislamiento e identificación de las cepas infectantes, y en la implementación de métodos serológicos alternativos de diagnóstico, orientamos en nuestros laboratorios del Instituto de Higiene las tesis de grado de estudiantes de Bioquímica- UdelaR sobre:

Cultivo de *Leptospira* y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR.

Valoración del rendimiento diagnóstico como test serológico rápido de un procedimiento de aglutinación macroscópica en lámina, utilizando un antígeno termorresistente preparado localmente, y de un ensayo de ELISA, sensibilizado con antígenos leptospíricos preparados localmente, también como test serológico rápido.

Habiendo observado carencias en el enfoque médico de esta infección/enfermedad, acompañamos el trabajo monográfico de un grupo de estudiantes de medicina en el marco del Ciclo de Metodología Científica II de la carrera: Evaluación Comparativa del Conocimiento del Personal Médico y Veterinario sobre Leptospirosis Humana en Uruguay. Los objetivos fueron describir y comparar los conocimientos sobre epidemiología, clínica, diagnóstico y prevención de la Leptospirosis humana de médicos veterinarios y médicos del área humana en Uruguay.

Cumplida la meta de delinear el panorama general de situación de esta zoonosis en el país, fue necesario plantearse objetivos avanzados:

Establecer la seroprevalencia de infección por *Leptospira* en diferentes grupos humanos en riesgo, reconocer los serovares reactivos por MAT, conocer la importancia relativa de factores de riesgo conocidos para adquirir la infección, y establecer el impacto de la infección en esos grupos humanos. Sensibilizar a las autoridades sanitarias y referentes sociales a propósito de esta enfermedad y así favorecer la aplicación de medidas de prevención.

Progresar en el aislamiento y caracterización de cepas de *Leptospira* recuperadas de hemocultivos humanos, muestras ambientales, orina y órganos animales, para saber la prevalencia en el país de diferentes especies y variantes, noción que hasta el momento era sólo conocimiento impreciso e indirecto obtenido a partir del estudio de anticuerpos específicos en suero.

Estudiar en detalle el reservorio animal y la difusión ambiental de cepas de *Leptospira*, ampliando el aislamiento y la identificación molecular de cepas recuperadas en cultivo.

Inicialmente la tarea fue encarada con iniciativa propia y apoyo de la Fundación Manuel Pérez FM; luego fue combinada con diversas instituciones y equipos de investigadores en el proyecto Alianza ANII 2015-2018 “Creación y caracterización de un banco de cepas de *Leptospiras* aisladas de casos de Leptospirosis bovina en Uruguay.”

El objetivo general de este proyecto fue aislar, identificar y tipificar las especies de *Leptospira* provenientes de casos de infecciones agudas o crónicas en el ganado bovino en Uruguay, mediante técnicas de microbiología tradicional, métodos serológicos y métodos moleculares. Se entendió que el alcance exitoso de este objetivo podría contribuir a mejorar la eficacia de las vacunas veterinarias contra *Leptospira* de uso en el país por la incorporación de antígenos de serovares locales.

Con apoyo del Espacio Interdisciplinario, UdelaR, nos propusimos luego producir nuevos conocimientos útiles para contribuir al control de los daños económicos y sanitarios de la Leptospirosis, estudiando la prevalencia y características de las infecciones por *Leptospira* en poblaciones equinas y roedores, como parte del reservorio microbiano.

Más extensamente, nuestros objetivos recientes fueron investigar y evaluar la presencia y difusión de la enfermedad Leptospirosis en equinos y trabajadores que están en contacto con ellos en distintos establecimientos y ámbitos laborales:

Determinar la prevalencia de la infección y la enfermedad en poblaciones de equinos de nuestro país; evaluar la potencialidad de los equinos como fuente de infección para la transmisión de la enfermedad en trabajadores expuestos; determinar qué serovares son más frecuentemente reactivos por MAT en equinos y en trabajadores infectados de los distintos establecimientos; identificar el patrón epidemiológico y los factores de riesgo asociados a la enfermedad en los animales y los trabajadores; conocer el impacto económico y social de esta enfermedad tanto sea en la afección hacia el animal como hacia el trabajador vinculado al mismo; contribuir a generar conocimiento social de esta zoonosis, capacitar a los trabajadores sobre los peligros de exposición en sus tareas laborales e implementar con ellos medidas de prevención y promoción en Salud.

Contribuimos de modo paralelo al estudio de prevalencia de anticuerpos anti *Leptospira* en perros, y de análisis serológico, cultivo y examen molecular de patógenos específicos en pinnípedos en libertad en Uruguay. El objetivo de este estudio fue realizar un relevamiento de patógenos reconocidos en lobos y leones marinos en libertad en Uruguay. Se realizaron pruebas para identificar infecciones por *Leptospira* spp., Virus del moquillo canino, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Mycobacterium* spp.

Nuestros **objetivos específicos más recientes** incluyen la ampliación de estudios sobre el reservorio animal, la búsqueda de variantes microbianas atenuadas potencialmente inmunogénicas, y se centran nuevamente en la infección humana, a partir de las necesidades de conocimiento identificadas en la trayectoria previa de estudio:

-Estudio de seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en trabajadores de frigoríficos.

-Leptospirosis humana: respuesta inmune diferencial según sexo; hemocultivo y evolución en largo plazo de la sintomatología. Los objetivos concretos de este proyecto son: comparar la respuesta inmune a esta

afección en ambos sexos; realizar el seguimiento prolongado, clínico y paraclínico de los pacientes diagnosticados como positivos; aumentar el número de aislamientos de *Leptospira* a partir de hemocultivos humanos, y el detalle de su identificación.

Materiales y métodos.

Para instalar nuestro servicio diagnóstico de base y cumplir con los objetivos de nuestro proyecto inicial de investigación, se definieron las características epidemiológicas y clínicas de un caso presuntivo de leptospirosis de acuerdo a la experiencia local (Braselli A y col, 1998) y la bibliografía internacional; se diseñó el formulario de recolección de datos clínicos y epidemiológicos para acompañar el envío y recepción de muestras; se diseñaron los instructivos para toma y envío de muestras; se puso a punto la Técnica de MicroAglutinación MAT con cepas cedidas por instituciones que la practicaban; se ensayó una prueba de inmunofluorescencia (luego modificada para ensayo extenso formal), y se estableció conexión con múltiples instituciones públicas y privadas interesadas, entre ellas varias que anteriormente enviaban los sueros humanos a estudio en DILAVE.

El test de Chi cuadrado fue empleado para excluir la independencia entre dos variables cuando se examinaron los resultados clínicos y de evolución. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Epi Info para Windows.

Los resultados de estos estudios iniciales fueron expuestos con apoyo de materiales audiovisuales preparados por nuestro equipo de trabajo, en actividades de extensión y difusión a grupos humanos de interés e instituciones cooperantes en múltiples puntos del país.

Para confirmación diagnóstica en todo el período, se estudiaron sueros pareados (fase aguda y convaleciente, tomados 15 a 20 días después del primero) de pacientes con sospecha clínica de Leptospirosis derivados por médicos de servicios públicos y privados de atención de salud.

Las reacciones MAT se realizaron de acuerdo a la técnica estándar de 2 etapas (Faine S y col, 2000) (Haake DA, Levett PN, 2015) (Hem S et al, 2016).

La **1era. etapa** de tamizaje, enfrentó 100 µl de una dilución 1/25 de cada suero con 100 µl de cada uno de los cultivos de *Leptospira* seleccionados (Australis Australis; Australis Bratislava; Autumnalis Autumnalis; Autumnalis Butembo; Ballum Castellonis; Canicola Canicola; Cynopteri Cynopteri; Grippytyphosa Grippytyphosa; Hebdomadis Hebdomadis; Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae; Mini Mini; Pomona Pomona; Pomona Kennewicki; Pyrogenes Pyrogenes; Sejroe Hardjo; Sejroe Wolffi; Semarang Patoc; Tarassovi Tarassovi). Se definieron como positivos los sueros que observados con el microscopio de campo oscuro mostraban menos de 50% de las leptospiras libres, sin aglutinar, de una o más variantes. Sueros positivos y negativos conocidos fueron incluidos como controles en cada placa.

La **segunda etapa** consistió en enfrentar diluciones seriadas de los sueros con los serovares que dieron resultado positivo en la prueba de tamizaje. El **título** se definió como el inverso de la última dilución que mostró resultado positivo. Un título de **400 o más** para uno o más serovares en el suero de fase aguda o el de fase convalescente, o un aumento de 4 veces entre el título de la primera y segunda muestra se consideraron como **caso confirmado** de infección por *Leptospira*.

Un suero que mostró títulos de 200 para un serovar o de 100 para varios serovares se informó como **sugestivo de infección**; si la segunda o tercera muestra de suero de ese paciente tuvo resultados similares se interpretó como una infección pasada, o posible efecto de reacciones cruzadas.

Estos criterios y puntos de corte fueron establecidos mediante estudio comparativo de dos grupos de personas: uno supuestamente normal, de donantes de sangre, y otro de trabajadores en riesgo de una planta OSE de tratamiento de efluentes y del sector lácteo.

Para la IFI ensayada en nuestro proyecto inicial se utilizaron láminas adecuadas con hoyos de origen comercial (Multi-Spot, Thermo Scientific ®) y se siguió con adaptaciones el procedimiento descrito previamente por Torten *et al.* (Torten M y col, 1966) Las láminas se sensibilizaron con una mezcla de cultivos frescos (7-8 días, aprox. 10^7 bacterias/ml) pertenecientes a los siguientes serovares Pyrogenes,

Bratislava, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Luego de fijarlas y secarlas, a cada hoyo se agregaron 35 µl de una dilución 1/100 del suero a ensayar. Se incubaron a 37°C por 30 minutos, y luego se lavaron dos veces con fosfato buffer salino (PBS)1X pH 7.2. A cada hoyo se agregaron luego 35 µl de una dilución 1/1.000 del conjugado comercial anti-Ig **humanas totales** marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®, St Louis MO 63103, USA) y las láminas se incubaron a 37°C por 30 minutos. En cada lámina se incluyeron sueros positivos y negativos conocidos como controles. Para la lectura se usó un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse®).

Los ensayos de IFI se practicaron de este modo en 570 primeras (o únicas) muestras de pacientes examinados. La sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo del método fueron determinados por comparación con los resultados obtenidos en paralelo por MAT. (Schelotto F et al, 2012)

Se obtuvieron también en este serie muestras de sangre para cultivo en 136 pacientes y de orina en 28. Se recogieron datos clínicos y epidemiológicos de todos los pacientes.

El proyecto CSIC de comienzo fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Medicina, y cada paciente firmó un consentimiento informado.

Ensayo de la técnica de IFI-IgM de “preparación local” empleada luego en sucesivos programas de estudio.

Las cepas de *Leptospira* (Australis Bratislava, Ballum Castellonis, Icterohaemorrhagiae Copenhageni y Canicola Canicola) utilizadas para sensibilizar las láminas de inmunofluorescencia (Multi-Spot, Thermo Scientific ®) fueron seleccionadas en función de los serovares que habitualmente dan títulos altos en las reacciones de MAT en nuestro laboratorio.

El procedimiento de sensibilización fué idéntico al descrito más arriba. Para la detección de IgM se agregaron en cada hoyo 20 µl de una dilución 1/50 de cada suero a ensayar y las láminas se incubaron a 37°C por 30 minutos. Luego se lavaron 3 veces con agitación, y para el revelado en cada hoyo se colocaron 20 µl de una dilución 1/15 del conjugado comercial anti-IgM humana obtenido en cabra y marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®, St Louis MO 63103, USA). En cada lámina se incorporaron como controles sueros positivos y negativos conocidos. Para la lectura se usó un microscopio de epifluorescencia Nikon® ECLIPSE 80i, con filtro de 495nm (Meny P y col, 2014).

Análisis estadístico:

La sensibilidad y especificidad de la IFI-IgM de diseño local versus MAT se establecieron utilizando una tabla de doble entrada.

Para calcular VPP de la IF-IgM se utilizó el teorema de Bayes tomando una prevalencia anual estimada de 15 casos de infección/100.000 habitantes.

El grado de concordancia de los resultados obtenidos por dos observadores diferentes (PM, GV) se evaluó utilizando el test de Kappa.

Para valorar el test inmunocromatográfico comercial (Aria-Leptospira IgG/IgM COMBO RAPID TEST®) se estudiaron 60 sueros de pacientes obtenidos en etapa temprana: 30 con infección aguda por *Leptospira* confirmada por el resultado de MAT (1era. muestra negativa y 2da. positiva) y 30 sin infección documentada por MAT (1era. y 2da. muestra obtenida 15-20 días después de la primera, negativas) (Iglesias T y col, 2018).

Evaluación de la PCR en tiempo real como técnica diagnóstica.

Entre enero de 2012 y abril de 2013 se estudiaron por MAT y q-PCR 235 muestras de suero de pacientes con sospecha clínica de Leptospirosis que fueron enviadas a nuestro laboratorio. Las muestras se conservaron a -20° C hasta su procesamiento. También se incluyeron 20 muestras de suero de pacientes con Sífilis y 15 con infección aguda por el virus de Hepatitis B (González S y col, 2013).

La **MAT** se realizó en todas las muestras de suero siguiendo el procedimiento en 2 etapas descrito más arriba, y se utilizaron los mismos criterios para la interpretación de los resultados.

Se evaluó la menor carga microbiana detectable en suero, plasma o sangre con este procedimiento.

Para la **extracción de ADN** de las muestras de suero se usó el kit comercial GE, *illustra*™®, Healthcare Life Sciences, Sweden. El ADN se conservó a -20°C. Una muestra de suero negativa se usó como control en todas las reacciones de extracción. Para la amplificación por qPCR con los cebadores lipL32-45F y lipL32-

Rb seguimos el procedimiento descrito por Stoddard et al., modificado luego por Bourhy y col. Como control interno de inhibición se usaron los cebadores para el gen eucariota *maseP* (Stoddard RA et al, 2009) (Bourhy P y col, 2011).

Para la amplificación y lectura se usó el equipo Rotor-Gene 6000 system (CorbettLife Science, Sydney, Australia) y el protocolo fue el siguiente: activación durante 15 minutos a 95°C seguido de 45 ciclos de amplificación con las siguientes temperaturas y tiempos, 95° C por 10 segundos, 55° C por 15 segundos y 72° C, 20 segundos. En cada reacción se incluyeron controles positivos y negativos.

Cultivo de *Leptospira* y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR: Amplificación al azar de ADN polimórfico (Ifrañ S, 2006).

Muestras clínicas y cultivos para aislamiento.

Se partió de 73 muestras clínicas recibidas en el laboratorio de setiembre 2003 a octubre 2004, que consistían en suero y sangre, a veces acompañadas de orina o LCR. Correspondían a pacientes del Ministerio de Salud Pública y de mutualistas de Montevideo y el interior.

Se utilizó el suero de los pacientes para diagnóstico por MAT; se utilizó la sangre conteniendo anticoagulante, la orina o el líquido cefalorraquídeo en estudios de aislamiento de *Leptospira*, inoculando en diferentes medios de cultivo.

La muestra de **sangre** de cada paciente extraída durante el período febril leptospirémico, fue sembrada con volúmenes de 50, 100 y 150 µl en tres tubos con 5 ml de medio de cultivo semisólido Fletcher enriquecido con suero de conejo. Se incubó en estufa a 28-30°C, durante un período de 6 meses (Weyant R S, et al 2002). Se exploró el crecimiento por microscopía de campo oscuro cada 7 días durante las primeras cinco semanas y dos veces al mes durante 6 meses antes de diagnosticar el cultivo como negativo.

Cuando se detectó crecimiento y el cultivo no estaba contaminado, se realizó un repique a medio Fletcher enriquecido con piruvato (0.09 g de piruvato de sodio por litro) en el cuál las leptospiras se pudieron mantener viables conservándolas hasta 2 meses (Weyant R S, et al 2002).

Las muestras de **orina** (n=3) llegaron al laboratorio refrigeradas (4°C a 8°C), cuando fue necesario se realizó la corrección de pH antes de sembrarlas mediante una dilución 1/10 en PBS estéril. Se sembraron de la misma manera que los hemocultivos. Se controló el crecimiento de *Leptospira* por microscopía de campo oscuro (Haake DA, Levett PN 2015).

El **LCR** (n=1) se envió al laboratorio en condiciones asépticas sin el agregado de conservadores. Se protegió de la luz solar y se mantuvo refrigerado hasta el momento de la inoculación. Fueron sembrados 0.25 ml en dos tubos, uno conteniendo medio de cultivo semisólido Fletcher y otro con el agregado de neomicina (1 disco de 30 µg cada 5ml de cultivo) (Haake DA, Levett PN 2015). No se realizaron diluciones del mismo. Se incubó a 28-30°C, y se examinó el crecimiento por microscopía de campo oscuro como habitualmente.

Cuando se detectó crecimiento en un cultivo contaminado, o cuando se sospechó que la muestra clínica para aislamiento llegaba al laboratorio contaminada, se utilizaron caldos de cultivo selectivos, como Stuart o EMJH con el agregado de agentes quimiostáticos como neomicina o 5-fluorouracilo (200 µg/ml). Como etapa complementaria de purificación se realizó el filtrado de cultivos contaminados desde el medio selectivo a un medio de enriquecimiento no selectivo, utilizando filtros de membrana de 0.22 µm de poro.

Como alternativa de purificación de cultivos contaminados, o para revitalizarlos y mantener su virulencia, se practicó la inoculación intraperitoneal de 1 ml en cobayos. Las leptospiras migran más rápidamente que otras bacterias desde la cavidad peritoneal a la sangre, de donde son recuperadas a partir de 20 minutos a 1 hora más tarde por punción intracardiaca.

Caracterización genética de los aislamientos mediante RAPD-PCR.

Se procedió a la liberación de ADN por dos diferentes métodos:

Extracción y purificación de ADN según protocolo basado en el empleo de FCA Fenol neutro-Cloroformo-Alcohol isoamílico, modificado para aplicación a *Leptospira*.

Extracción mediante ebullición a 100°C, método empleado previamente en el laboratorio para otros microorganismos, con ligeras variantes (Betancor L et al, 2004).

Para la amplificación al azar se emplearon 4 cebadores previamente ensayados, con estas secuencias en dirección 5'-3': *Primer 23L*: (CCGAAGCTGC); *Primer OPA-4*: (AATCGGGCTG); *Primer OPB-15*: (CCAGGGTGTT) y *Primer OPB-17*: (AGGGAACGAG).

Se trabajó en termociclador Hybaid (Ashford, United Kingdom) utilizando el siguiente programa: 4 ciclos a 94°C durante 4 minutos, 35°C 4 minutos y 72°C 4 minutos. 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 35°C 1 minuto, 72°C 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La temperatura final del termociclador para mantenimiento de la muestra fue de 4°C.

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Los patrones de bandas de los aislamientos fueron comparados con los de cepas de referencia examinados con el mismo procedimiento. (Betancor L et al, 2004).

Evaluación de otros métodos de laboratorio (macroaglutinación y ELISA) para el diagnóstico de Leptospirosis humana (Geymonat JP, 2011).

Se analizaron por Macroaglutinación (técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente TR) y por ELISA sueros de pacientes con sospecha clínica de Leptospirosis, que llegaron enviados para diagnóstico al Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina (UdelaR).

Se estudiaron por Macroaglutinación 298 primeras muestras: 127 que fueron positivas también por MAT en primera o segunda muestra, y 171 con doble MAT negativa. Por ELISA se ensayaron 44 primeros sueros de pares que fueron siempre negativos en primera muestra examinada por MAT, y luego positivos (20) o negativos (24) en segundo suero ensayado por MAT.

El procedimiento seguido para la realización de la MAT fue el descrito más arriba.

Técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente.

Para la obtención del antígeno se utilizaron las cepas de *Leptospira interrogans* con circulación regional pertenecientes a los serovares Pomona Pomona, Pyrogenes Pyrogenes, Australis Bratislava, Canicola Canicola e Icterohaemorrhagiae Copenhageni. Los cultivos se mezclaron en pool, que se inactivó con formol al 0,2%, se lavó repetidamente con PBS, se calentó a 100°C 30 minutos, se suplementó con Tween 80 (0,1mg/mL) y se guardó en heladera a 4°C. Para realizar el test de macroaglutinación se mezclaron partes iguales (30µL) del antígeno (**previamente homogeneizado por agitación vigorosa**) con el suero del paciente sobre una placa de vidrio cuadrado. La lectura se realizó simple vista dentro de los 4 minutos. La formación de grumos gruesos se interpretó como resultado positivo. En cada ensayo se incluyó un suero control positivo, uno control negativo, y un control de la suspensión antigénica. Se ensayaron sueros de pacientes con otras enfermedades para descartar reacciones cruzadas.

Ensayo de un método de ELISA.

Para la obtención del antígeno “crudo” como reactivo de captura se utilizaron cepas de *Leptospira interrogans* de los serovares Australis Bratislava, Icterohaemorrhagiae Copenhageni, Sejroe Hardjo prajitno, Ballum Castellonis, Pyrogenes Pyrogenes y Pomona Pomona. Cada una fue cultivada individualmente en medio EMJH a 28°C durante 20 a 25 días hasta alcanzar una concentración de 5×10^9 cel/ml. Se conservaron a -20°C durante 7 días, y luego se realizaron tres pasos de centrifugación a 10.000g durante 30 minutos y lavados con PBS 0,02M pH 7,2. Posteriormente se hizo la lisis celular por sonicación (pulsos de 20KHz, durante 3 minutos, en hielo). La concentración proteica de cada antígeno se determinó usando el método del ácido bicinónico (SIGMA™). Se preparó un *pool* homogéneo de antígenos y se estableció por ensayo la concentración de proteínas totales de 7µg/ml como la óptima para diferenciar entre sueros negativos y positivos conocidos.

Las placas de ELISA con 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp de NUNC™) se sensibilizaron con 100µl de antígeno y se dejaron en incubación 24 horas a 4°C. Se realizaron seis lavados con PBS-Tween 20 (0,05%) y después se bloqueó con 200µl de PBS-Tween con 5% de leche descremada. Se incubó 1 hora a 37°C y se lavó nuevamente 6 veces. Se diluyeron los sueros de los pacientes 1:5000 en tampón de incubación (Tris

0,05M, NaCl 0,15M, pH 7,3, 2% BSA); se colocaron 100µl de dichas diluciones en cada pocillo, se incubó 30 minutos a 37°C y se ejecutaron seis lavados. Se agregaron 100µL de un anticuerpo de cabra anti IgG+IgA+IgM humanas conjugado a peroxidasa (INVITROGEN™) diluido 1:5000 en tampón de incubación; se incubó 30 minutos a 37°C y se lavó 6 veces. Se agregaron 100µl de sustrato cromogénico (OPD), se incubó 15 minutos a 37°C en oscuridad, y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2N. La lectura se realizó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492nm. En cada ensayo se analizaron paralelamente un control positivo, uno negativo y sueros positivos para otras enfermedades.

Para determinar con intervalo de confianza 95% la sensibilidad, especificidad y demás parámetros del test de aglutinación y el ensayo de ELISA se utilizó el software de procesamiento de datos tabulados EPIDAT 3.1, de libre distribución. Para calcular el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) se aplicó el Teorema de Bayes.

Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre Leptospirosis humana en Uruguay (Arriola N y col, 2015).

Se realizó un estudio observacional descriptivo, en el cual se evaluaron los conocimientos de médicos y veterinarios sobre Leptospirosis humana.

Los datos obtenidos derivaron de una fuente primaria mediante un cuestionario elaborado en el programa Form Designer de Epi Info 7™ y aplicado a los participantes a través de una entrevista telefónica. Se enviaron previamente por vía electrónica los consentimientos informados, que debían ser respondidos afirmativamente en caso de acceder a participar en el estudio.

Los datos fueron registrados en medio electrónico con el programa Enter, y el análisis de datos se practicó con Classic Analysis, ambos de Epi Info 7™ correlacionando las respuestas con las que se consideraron correctas, y comparando lo expresado entre profesionales médicos y veterinarios.

Se realizó una selección representativa de la población de profesionales registrada en los padrones nacionales, previa carta-solicitud y aprobación de las pertinentes autoridades.

Mediante muestreo aleatorio simple, utilizando una lista de números randomizados generada por la función Math.random, obtenida con el programa OpenEpi, Versión 3, se seleccionó un grupo de 385 profesionales médicos del área humana y otro de 385 profesionales veterinarios.

El tamaño muestral se calculó utilizando el software Sample Size Calculator: Comparing Two Proportions, disponible on-line en <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>, previendo un nivel de significación de 95%, una potencia de 80% y una proporción esperable en las variables a evaluar de 50% de respuestas correctas en ambos grupos.

Las variables registradas fueron departamento de trabajo, profesión, especialidad, edad, antigüedad, y conocimientos acerca de: incidencia, mortalidad, población afectada, ocupación de infectados, reservorio, forma de transmisión, presentación clínica, síntomas, diagnóstico y criterios de prevención relacionados a Leptospirosis humana.

Se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión para variables cuantitativas, y las variables cualitativas se expresaron en porcentajes. Las comparaciones de datos numéricos entre los dos grupos se realizaron con la prueba de t de Student para muestras independientes y las comparaciones de variables cualitativas se llevaron a cabo mediante el test de Chi cuadrado.

A fin de mantener la confidencialidad de los datos, toda información proporcionada por los sujetos de investigación, fue anonimizada irreversiblemente, y utilizada únicamente con fines académicos.

Caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental (Meny P y col, 2017).

Las cepas estudiadas fueron recuperadas entre enero de 2010 y diciembre de 2016. Para la extracción de ADN se cultivaron en medio líquido EMJH hasta que alcanzaron una concentración aproximada de 10⁸ bacterias/ml. Se usó el kit comercial de extracción DNeasy Blood & Tissue® kit (Qiagen®, Germany). El ADN obtenido se conservó a -20°C hasta su uso en las diferentes reacciones de PCR.

Para la identificación inicial se hicieron reacciones de amplificación por PCR para 2 genes, el que codifica la **subunidad 16S del ARN ribosomal** que está presente en todas las leptospiras y el que codifica para la **lipoproteína LipL32** que solo se encuentra en las cepas definidas como **patogénicas**. Para separar *L. biflexa*

de otras cepas saprófitas se realizó otra reacción de PCR dirigida al **gen 23S**. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz UV usando el sistema FOTO/Analyst Investigator Eclipse FOTODYNE® system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y las imágenes obtenidas fueron conservadas en formato electrónico.

Identificación a nivel de especie por secuenciación parcial del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal.

Se usaron los cebadores Lepto A y Lepto B para amplificar un fragmento de 330 pares de bases del gen 16S. Los productos de PCR purificados se utilizaron como molde junto con los cebadores internos LeptoC y S4 para la secuenciación. Los resultados obtenidos se compararon usando la herramienta Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con secuencias de especies de *Leptospira* conocidas depositadas en la base de datos GenBank (Postic D y col, 2000).

Análisis por MLVA (MultiLocus Variable-number of tandem repeats (VNTR Analysis).

Los aislamientos humanos con resultado positivo para los genes 16S y LipL32 (**patogénicas**) se analizaron por el procedimiento de MLVA-VNTR descrito por Salaün y cols. Se usaron 3 pares de cebadores para amplificar y determinar el número de repeticiones presentes en 3 loci diferentes, VNTR 4, VNTR 7 y VNTR 10, que permiten caracterizar cepas de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Salaün L et al, 2006). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en agarosa, se determinó el tamaño de cada amplicón y se calculó el número de repeticiones para cada uno. Los resultados se compararon en tablas con los conocidos para diferentes cepas.

Estudio mediante Multilocus Sequence Typing (MLST).

Esta técnica se aplicó sobre 2 aislamientos humanos, siguiendo un procedimiento ya descrito (Boonsilp S y cols, 2013). Se amplificaron fragmentos internos de los 7 genes “house-keeping” ya mencionados, que luego fueron secuenciados usando la plataforma RPT01A-PDTIS/FIOCRUZ DNA (<http://plataformas.cdts.fiocruz.br/>). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias conocidas para determinar el perfil alélico y el secuenciotipo utilizando el programa MAFFT (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/).

Electroforesis en campos pulsantes (PFGE).

Este procedimiento se aplicó sobre los 2 aislamientos humanos estudiados por MLST. Se siguió la técnica previamente descrita (Galloway RL y Levett PN, 2010). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una densidad óptica de 1.4 con una longitud de onda de 610 nm. Se mezclaron con el mismo volumen de una solución al 1.2% de agarosa grado certificado PFGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) precalentada y mantenida a 55°C. Las suspensiones se colocaron en moldes adecuados y se dejaron solidificar. Los bloques se lavaron, se cortaron del tamaño recomendado y se digirieron por 2 horas a 37°C con la enzima de restricción *NotI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA). Los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa usando el sistema CHEF DR-II (Bio-Rad®). Bloques con ADN de *Salmonella enterica* serotipo Braenderup (CDCH9812) digeridos con la enzima *XbaI* se incluyeron como estándar de tamaños. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz UV usando el sistema FOTO/Analyst Investigator Eclipse FOTODYNE® system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y las imágenes obtenidas fueron conservadas. La comparación de los patrones de bandas se realizó a simple vista.

Para estudiar la seroprevalencia de infección por *Leptospira* en diferentes grupos humanos en riesgo por factores ambientales, laborales o sociales, la identificación de zonas del país y grupos humanos con riesgo de infectarse con *Leptospira* se basó en datos obtenidos en nuestro laboratorio a partir de las fichas de notificación que acompañan en general las muestras para diagnóstico (Meny P y col, 2019). Los lugares y las personas fueron visitados por integrantes de equipo. La participación en el estudio fue

voluntaria. Teniendo en cuenta una seroprevalencia esperada de 50% en poblaciones en riego, se calculó una muestra de 300 personas. Entre abril de 2015 y abril de 2017 se estudiaron 308 personas (300 con factores de riesgo y 8 sin ellos) incluyendo trabajadores de arrozales en Treinta y Tres, Rocha y Lavalleja (12 visitas); tamberos de Florida, Colonia y Río Negro (4 visitas); habitantes de asentamientos con actividades informales de reciclado y crianza de animales en Montevideo y Canelones (3 lugares, 9 visitas) y trabajadores temporarios en plantas de reciclado en Montevideo (4 lugares, 5 visitas). Se organizaron además 5 reuniones en San José, Durazno, Salto, Tacuarembó y Treinta y Tres para la difusión de información sobre el agente y la enfermedad. Las visitas y reuniones se aprovecharon para obtener muestras de trabajadores, pobladores, profesionales y otros. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina y cada participante firmó previamente un consentimiento informado. A su vez cada uno respondió un cuestionario para evaluar la presencia de factores de riesgo y las condiciones de trabajo.

Recolección de muestras y procedimientos de laboratorio.

Muestras humanas, animales y ambientales.

La sangre de los 308 voluntarios se obtuvo por punción venosa y se colocó en tubos con acelerador para separar rápidamente el suero. Cada suero se estudió por MAT y por IFI-IgM como se describió más arriba. Se obtuvo también sangre de 50 perros y 22 caballos que estaban en contacto estrecho con trabajadores de arrozales, de tambos y personas que habitaban en asentamientos. Las muestras de los animales se obtuvieron siguiendo las recomendaciones **ARRIVE** por sus siglas en inglés -Animal Research Reporting of In Vivo Experiments.

La presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* se estableció por la técnica de MAT. Cultivos de los serovares Ballum Castellonis, Autumnalis Butembo, Cynopteri Cynopteri, Canicola Canicola, Grippytyphosa Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae, Pomona Pomona y Pyrogenes Pyrogenes se usaron como antígenos en la MAT para perros; Ballum Castellonis, Canicola Canicola, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa Grippytyphosa, Pomona Pomona, Sejroe Hardjo, Sejroe Hardjo bovis, Sejroe Wolffii y Tarassovi Tarassovi para muestras de caballos. Un título ≥ 100 se consideró como indicador de infección (actual o pasada) en estos animales. (Grüne Löffler S y col, 2014).

Se tomaron además muestras de cuerpos de agua próximos a los hogares y lugares de trabajo de personas incluidas en el estudio (10 muestras de campos de arroz, 9 de 4 tambos, y 6 de tres asentamientos). Las muestras se recogieron en recipientes estériles y se transportaron al laboratorio refrigeradas (4-8°C). Luego de agitarlas vigorosamente, se pasaron por filtros de 0.22 μm y 500 μl de cada filtrado se sembraron en medio semi-sólido Fletcher y medio líquido EMJH (Difco-BD®). Los medios fueron incubados a 28°C y se observaron periódicamente en campo oscuro para evidenciar crecimiento. Los cultivos recuperados fueron estudiados por procedimientos convencionales ya descritos (Pinto PS y col, 2017).

Cuestionarios personales de relevamiento.

Se recogieron de todos los trabajadores estudiados, para determinar la presencia de factores de riesgo conocidos para infección por *Leptospira*: condiciones laborales, agua potencialmente contaminada, contacto con animales y otros. Se aportó información verbal y en folleto impreso sobre la enfermedad, las circunstancias de riesgo, las medidas preventivas recomendadas, y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno.

Análisis estadístico.

Se usaron el paquete SPSS y el software Epi-Info 2000. Se realizó un análisis univariado inicial con las medidas de resumen apropiadas para variables cuali y cuantitativas. Se exploraron asociaciones estadísticas entre variables potencialmente dependientes, y se emplearon los tests de Chi cuadrado o exacto de Fisher para excluir la independencia entre variables con $p < 0.05$. Finalmente, se empleó la técnica de regresión logística para el análisis multivariado que permitió seleccionar los factores que realmente explicaban la seroreactividad.

Para estudiar detalles del reservorio vacuno de *Leptospira*,

-Se contribuyó de modo esporádico al **diagnóstico por MAT de infecciones en rodeos bovinos**, con muestras enviadas por profesionales del área pública y privada, y se procesaron muestras de relevamientos epidemiológicos organizados con más de 700 sueros. (Puentes R et al, 2011).

-Se procuró **el aislamiento y la identificación de las cepas involucradas en infecciones bovinas, agudas o crónicas.**

De 2014 a 2018 se obtuvieron 437 muestras de orina tomadas con asepsia por punción vesical y 612 riñones en la línea de faena de 22 mataderos que recibieron animales de distintas zonas a lo largo de país. Riñón y orina no correspondieron al mismo animal, por lo tanto se tomaron como independientes. Se estudiaron además en el laboratorio muestras de orina y de órganos bovinos tomadas por nuestro equipo o enviadas ya sembradas por veterinarios de campo, procedentes de 166 rodeos con sospecha o diagnóstico previo de infección por *Leptospira* (mínimo 5 muestras/rodeo). Nuestras visitas incluyeron la toma ocasional de muestras de agua ambiental, que fueron cultivadas y examinadas según ya explicado.

Las muestras de orina (100 µl) se sembraron *in-situ* en medio líquido EMJH con el agregado de 5-Fluorouracilo (EMJH-5FU). En el laboratorio se realizaron subcultivos 1/10 y 1/100 de cada tubo original en el mismo medio, y se incubaron en conjunto.

Los riñones se transportaron refrigerados al laboratorio y se procesaron dentro de las 6 horas de recibidos.

De cada uno se tomó, de forma estéril y en cabina de seguridad biológica, un fragmento de aprox. 10 gramos y se colocó en una bolsa para stomacher. Se agregaron 10 ml de PBS 1X estéril y se procesaron en el masticador hasta obtener una suspensión homogénea. La mezcla se dejó asentar por 15 minutos y luego 250 µl del sobrenadante se sembraron en 5 ml de EMJH-5FU (tubo A). 500 µl del tubo A se colocaron en un segundo tubo con 5 ml de EMJH-5FU (tubo B). Un fragmento cilíndrico de cada riñón obtenido por punción con pipeta Pasteur de vidrio se sembró directamente en 5ml de medio Fletcher.

Los medios sembrados con riñones y orinas fueron incubados a 28°C y se observaron periódicamente en campo oscuro para evidenciar crecimiento. Se purificaron por los procedimientos ya descritos, y se identificaron con las técnicas ya mencionados de PCR, secuenciación parcial de genes microbianos y MLVA-VNTR. Con colaboración y sueros del IPMont se completó la clasificación en serogrupos por técnica de MAT inversa.

Para evaluar la presencia y difusión de la Leptospirosis en equinos y referentes humanos, se tomaron hasta Agosto 2020, muestras de sangre yugular (10 ml aprox.) de 880 equinos de grupos representativos de su distribución en el país: Haras de cría y entrenamiento, Studs de finalidad deportiva, Veterinaria y Remonta del Ejército, Predios de trabajo agropecuario, y Frigoríficos de faena para consumo y exportación.

Se examinaron las condiciones ambientales en cada sitio, se establecieron nexos de intercambio e información oral y escrita con responsables a cargo de los animales, y se tomaron adicionalmente 150 muestras personales de sangre, para estudiar la eventual relación de la infección equina con la de referentes humanos en contacto próximo.

Se registraron en planilla datos referidos al manejo y estado sanitario de los **equinos** en las distintas localizaciones: entrada de nuevos animales, cría, alimentación, monta natural o inseminación artificial, presencia de otras especies domésticas o de producción, control de animales silvestres, antecedentes de trastornos reproductivos y de otras patologías vinculables con la Leptospirosis.

Se recogieron de las **personas** en contacto, consentimiento informado y cuestionarios de relevamiento sobre factores de riesgo de infección, similares a los empleados previamente en el estudio comparativo de grupos sociales vulnerables.

Los sueros equinos se estudiaron con MAT como fue ya explicado, y los humanos con MAT e IFI-IgM.

Cuando los títulos equinos fueron iguales o superiores a 200, se procuró volver y recuperar muestras de orina animal por micción espontánea, para aislamiento e identificación de cepas infectantes, según metodología ya mencionada.

Los resultados, la información y su análisis estadístico se están procesando, con los procedimientos ya empleados en la elaboración de los datos del programa de estudio de poblaciones en riesgo.

Otros componentes del reservorio animal.

En el período considerado se han estudiado además por MAT 140 sueros de perros vinculados a poblaciones vulnerables, 123 sueros de Pinnipedos, lobos y leones marinos muestreados por veterinarios de la UdelaR en Isla de Lobos y Cabo Polonio, 109 sueros de ratas capturadas por nuestro equipo o por profesionales organizados en colaboración, y muestras ocasionales de ratones, jabalíes, nutrias, alpacas u otros animales.

Para los roedores se emplearon trampas Sherman y Tomahawk que se ubicaron con cebo apropiado en localizaciones varias de Montevideo y Canelones: sitios de disposición de residuos, cementerios, locales de cría de diversos animales, depósitos de alimentos y otros.

Las ratas capturadas fueron sedadas con éter, anestesiadas con ketamina-xylacina, y luego sexadas, medidas, pesadas y clasificadas en especies antes de la toma de muestras. La toma de sangre se realizó por punción cardíaca, y la eutanasia se cumplió con sobredosis de barbitúricos por vía intraperitoneal. Cumplida la disección con técnica aséptica, se tomaron muestras de orina por punción vesical que se sembraron in situ, y de riñones para procesamiento en el laboratorio con cultivo y PCR, de modo similar a lo descrito para bovinos.

Se trabajó con equipo completo de protección personal, se desecharon de modo seguro los residuos biológicos según la normativa del laboratorio, y se entregaron siempre que fue posible los ejemplares estudiados, sumergidos en formol, al Museo de Historia Natural para su colección.

Para cada uno de los subprogramas de estudios del reservorio se contó con protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, y con técnicos acreditados por la misma.

Nuestros estudios actuales sobre Leptospirosis humana: respuesta inmune diferencial según sexo; hemocultivo y evolución en largo plazo de la sintomatología, se están cumpliendo con las herramientas de laboratorio previamente validadas (técnicas de MAT y ELISA en suero, metodología de hemocultivo e identificación) y con un formulario de registro y seguimiento preparado y aplicado en colaboración con la contraparte sanitaria oficial (ASSE, MSP).

Resultados

Como consta en nuestro primer informe de resumen, entre diciembre de 2000 y diciembre de 2010 se estudiaron sueros de 6.778 pacientes, se realizaron más de 10.000 ensayos de MAT y se recuperaron 3 cepas de *Leptospira*, aunque solo una estuvo disponible para estudios posteriores.

Se confirmaron por MAT 945 infecciones. El número fue variable a lo largo de los años, con picos en 2002-2003, 2007 y 2010, coincidiendo con inundaciones que afectaron diferentes zonas del país (**tabla 1**).

Asimismo los casos predominaron en los meses más lluviosos del año (final del verano, otoño y primavera, ver **figura 5**). Estos patrones de distribución se mantuvieron en la 2ª década.

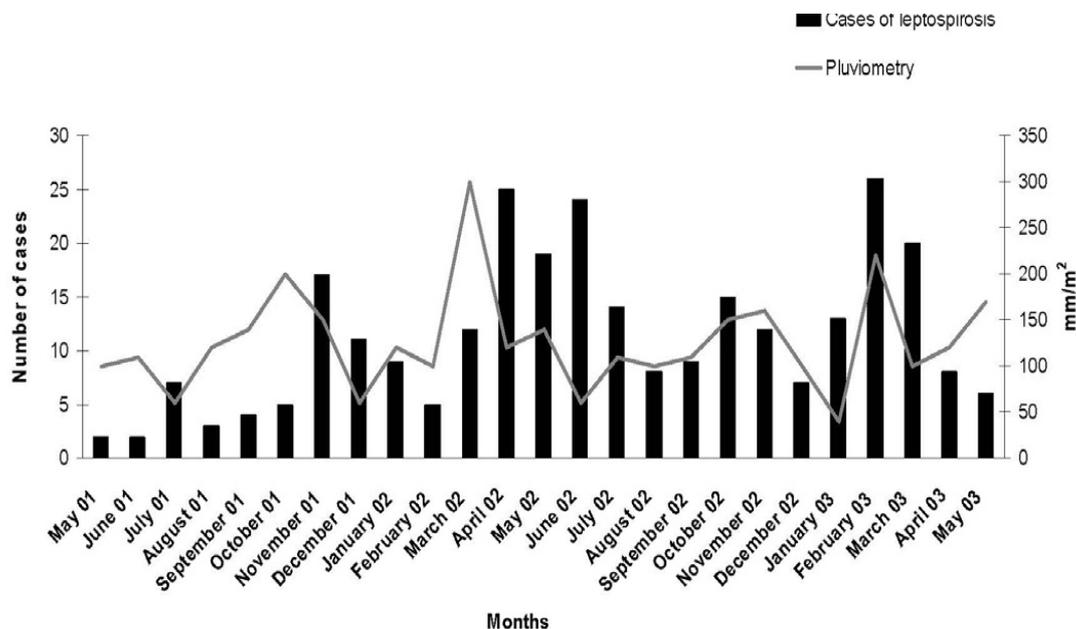


Figura 5. Número mensual de casos de Leptospirosis en relación a las precipitaciones. Mayo de 2001 - Mayo de 2003. Tomada de SCHELOTTO, F.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, S.; DEL MONTE, A.; IFRAN, S.; FLORES, K.; PARDO, L.; PARADA, D.; FILIPPINI, M.; BALSEIRO, V.; GEYMONAT, J.P. & VARELA, G. A ten-year follow-up of human Leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 54(2): 69-75, 2012.

La gran mayoría de los individuos con infección confirmada por *Leptospira* vivían fuera del departamento de Montevideo, aunque casi la mitad de la población total del país vive en ese departamento. Los departamentos donde se concentran las actividades de lechería (Florida y Colonia) mostraron las mayores tasas de infección. La proporción de casos urbanos fue relativamente mayor durante los años de menor incidencia general (19.5% en Montevideo en 2004-2005).

Los hombres representaron más del 93 % de los casos confirmados; el 50% fueron trabajadores con edades entre 20 y 40 años (**figura 6**).

Las **actividades rurales** realizadas por 57% de las personas infectadas fueron: producción lechera, ganadería bovina y ovina, agricultura, cultivo y cosecha de arroz, forestación y explotación forestal. El 14% de los pacientes estuvieron involucrados en otros trabajos de riesgo relacionados: faena, transporte de ganado, raciones, etc. Individuos desempleados, estudiantes, empleados de oficinas y personas que desarrollan otras actividades no enumeradas representaron una pequeña proporción de los casos infectados.

Los registros de la ocupación estuvieron disponibles en 498 pacientes positivos.

Características clínicas de los pacientes.

Tuvimos acceso a los registros clínicos de 491 pacientes con infección confirmada por *Leptospira*. La **tabla 2** muestra la distribución de los síntomas y signos presentes en ellos.

Tabla 1. Casos de Leptospirosis anuales confirmados por MAT y muertes reportadas en Uruguay (2000-2010).

Año	Número de casos	Número de muertes
2000	23	5
2001	58	7
2002	155	2
2003	118	6
2004	45	2
2005	89	3
2006	60	0
2007	138	2
2008	62	0
2009	43	0
2010	154	1
Total	945	28

Tabla 2. Síntomas y signos de 491 casos totalmente registrados en Uruguay, período 2000-2010.

Síntomas y signos	Número	(%)
Fiebre	462	94.1
Astenia	422	86
Mialgia	420	85.6
Cefalea	398	81
Fotofobia	52	10.5
Neurológicos	21	4.2
Vómitos	196	40
Dolor abdominal	147	30
Ictericia	133	27
Hepatomegalia	52	10.5
Tos	108	22
Expectoración	77	15.6
Dolor torácico	44	8.9
Falla renal aguda y desórdenes urinarios	167	34
Hiperemia conjuntival	162	33
Petequias	21	4.2
Total	491	100

Fiebre, astenia, artromialgias y cefalea estuvieron presentes en 80 a 100% de estos pacientes. Muchos pacientes mostraron al menos una característica clínica anormal adicional. Vómitos y otros signos y síntomas abdominales o hepáticos; hiperemia conjuntival y signos de alteración de la función renal o urinaria

(hematuria, proteinuria, piuria) estuvieron presentes en 30 a 40% de los casos confirmados. Todas u otras manifestaciones respiratorias (incluyendo hemoptisis o dificultad respiratoria) se vieron en el 20 a 30% de los casos. Fotofobia acompañada de dolor de cabeza, casi el 30% de las veces. Anormalidades neurológicas (meningitis, confusión transitoria) se observaron raramente (**ver tabla 2**). Proporciones similares se obtuvieron contabilizando síntomas y signos de pacientes de Florida, separadamente (Filippini M y col, 2003).

Las **formas ictericas** fueron más frecuentes en pacientes mayores de 40 años. Los registros mostraron 62 casos de ictericia en un total de 304 pacientes menores de 40 años, y 71 en 187 personas mayores (Prueba de independencia de chi-cuadrado = 18.104, valor $p = 0,00002092$). La hepatomegalia presentó una distribución por edades similar, pero las cifras fueron globalmente más bajas. La mayoría de las infecciones clínicamente manifiestas presentaron un patrón agudo y lo habitual fue la recuperación completa. El número anual de muertes por Leptospirosis nunca fue superior a 10, alcanzando un máximo de siete casos notificados en 2001, seis en 2003 y descendiendo a 0 en los años de baja incidencia (**Fuente: Departamento de Vigilancia en Salud DEVISA MSP, y tabla 1**). Las cifras fueron 25 muertes en 488 pacientes durante el período 2000-2005, y tres en 457 entre 2006 y 2010 (Prueba de independencia de **chi2**, corrección de Yates = 14,858, valor $p = 0,00011592$).

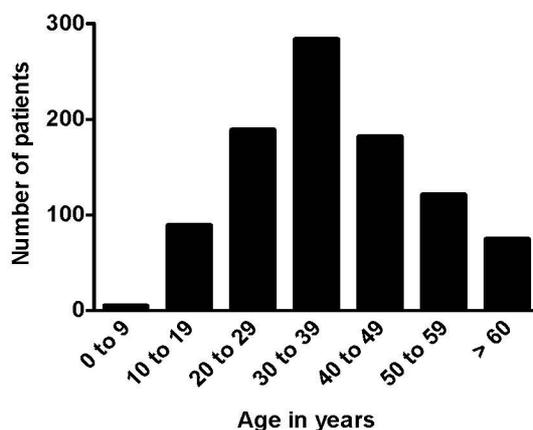


Figura 6. Edad de los pacientes con Leptospirosis confirmada por MAT. Tomada de :SCHELOTTO, F.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, S.; DEL MONTE, A.; IFRAN, S.; FLORES, K.; PARDO, L.; PARADA, D.; FILIPPINI, M.; BALSEIRO, V.; GEYMONAT, J.P. & VARELA, G. - A ten-year follow-up of human Leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 54(2): 69-75, 2012.

Los serovares más reactivos en MAT se muestran en la **figura 7**.

Los resultados de nuestro proyecto inicial de investigación, con importante perfil epidemiológico, fueron presentados en congresos de Medicina Interna, de la Sociedad de Patología Clínica, de la Asociación de Tecnólogos de Laboratorio y otros, y motivaron un proyecto de extensión financiado por UdelaR en 2003, con la finalidad de difundir resultados de investigación: **La Leptospirosis, una zoonosis frecuente en la población rural del Uruguay**. A partir de este proyecto respaldado, se elaboraron videos y otros materiales audiovisuales, y se visitaron varias localidades en 10 departamentos del país para presentar y explicar los datos obtenidos a trabajadores, productores, docentes, profesionales de la Salud humana y animal, con el fin de contribuir al alerta precoz, el empleo de medios diagnósticos, la prevención y el control de la afección.

La sensibilidad de la **IFI para anticuerpos totales** en las muestras iniciales fue del 67,63% en comparación con MAT, y la especificidad fue del 91,07%, con un valor predictivo positivo de 92,13%. En 40 de 78 pacientes con MAT inicial negativa y segunda positiva (**infección aguda**), la IFI fue positiva en la primera muestra, revelando el valor de este ensayo en la detección temprana.

En 70 de 285 pacientes sin resultado confirmado (sin segunda muestra para MAT) la IFI produjo una

reacción positiva; 64 de ellos (22,35%) podrían haber sido confirmados con MAT completa.

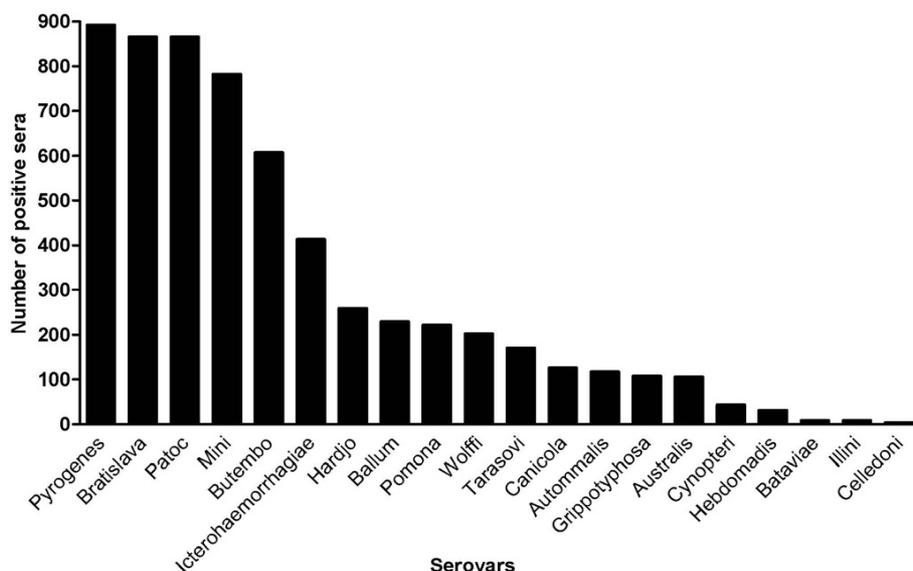


Figura 7. Serovares reactivos en MAT. Tomada de SCHELOTTO, F.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, S.; DEL MONTE, A.; IFRAN, S.; FLORES, K.; PARDO, L.; PARADA, D.; FILIPPINI, M.; BALSEIRO, V.; GEYMONAT, J.P. & VARELA, G. - A ten-year follow-up of human Leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 54(2): 69-75, 2012.

En el primer trabajo de tesina de grado orientada en el laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene (Ifra S, 2006) 14 de los 73 pacientes analizados (19%) mostraron resultado positivo en MAT. Solamente se obtuvieron tres hemocultivos positivos. Solo se pudo mantener viable un cultivo, obtenido de un paciente del departamento de Colonia. No hubo cultivos positivos de muestras de orina ni de la única de LCR procesada.

En el suero de dos cobayos inoculados con la cepa de origen humano se observó reactividad con varios serovares de *Leptospira*; los mayores títulos correspondieron a Australis Bratislava, Pomona Pomona, Pyrogenes Pyrogenes, Semarang Patoc y Sejroe Wolffii.

Los análisis con RAPD-PCR mostraron que todas las reacciones de amplificación produjeron bandas en el rango deseable de pesos moleculares entre 100 pb y 1500 pb.

Los patrones de bandas fueron considerados distintos cuando diferían en 2 o más bandas.

La concentración de ADN que generó una buena intensidad de bandas y que produjo un buen perfil genético fue de 50 ng.

Ambos métodos de extracción y purificación de ADN (fenol neutro-cloroformo-alcohol isoamílico y calentamiento a ebullición), produjeron perfiles genéticos similares para los serovares de *Leptospira* elegidos.

El cebador OPB-15 generó la mayor cantidad de bandas para todos los serovares de *Leptospira* elegidos en el ensayo y al igual que el cebador 23-L permitió definir un perfil idéntico entre la cepa de origen humano y la cepa del panel Pomona Pomona.

Los resultados de los ensayos de caracterización genética realizados en Australia revelaron que perfil genético de la cepa aislada perteneciente al paciente de Colonia, Juan Lacaze correspondió a *L. interrogans* serogrupo Pomona, serovar Pomona. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos por RAPD-PCR, tanto con el cebador 23-L, como con el cebador OPB-15.

En la **figura 8** se muestra el resultado de la estandarización del procedimiento RAPD-PCR con el cebador **23-L** y con molde de ADN de las cepas de colección Semarang patoc y Australis Bratislava.

En la **figura 9** se muestran los resultados de nuevos ensayos utilizando el cebador **23-L** con ADN de distintos serovares seleccionados del panel MAT, y con el ADN de la cepa aislada,

obtenidos con la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. A dos de ellas también se realizó la extracción de ADN por ebullición. Se incluyó una reacción de control con ADN de *Salmonella* Enteritidis, obtenido por ebullición.

En la **figura 10** se observan los resultados de la reacción RAPD-PCR con el **cebador OPB-15**, incluyendo ADN de todos los serovares seleccionados, y de la cepa aislada.

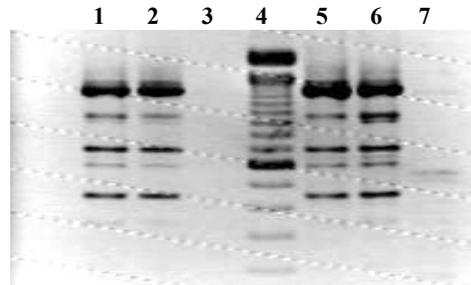


Figura 8. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN genómico 10 ng o 50 ng., con el cebador 23-L para los serovares Semarang Patoc y Australis Bratislava. Carril 1: 10 ng de ADN; Carril 2: 50 ng de ADN del serovar Australis Bratislava; Carril 3: mezcla de reacción más 10µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo); Carril 4: Marcador de peso molecular (100 pb; Gibco); Carril 5: 10 ng de ADN; Carril 6: 50 ng de ADN del serovar Semarang Patoc; Carril 7: mezcla de reacción más 10µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

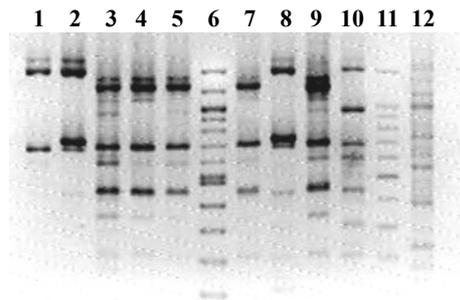


Figura 9. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN genómico (50 ng) de los serovares de colección elegidos y la cepa aislada; se utilizó cebador 23-L. Carril 1: Icterohaemorrhagiae Copenhageni; Carril 2: cepa aislada; Carril 3: Australis Bratislava; Carril 4: Australis Bratislava (extracción a 100°C); Carril 5: Semarang Patoc; Carril 6: Marcador de peso molecular (100 pb; Gibco); Carril 7: Semarang Patoc (extracción a 100°C); Carril 8: Pomona Pomona; Carril 9: Pyrogenes Pyrogenes; Carril 10: Sejroe Hardjo; Carril 11: Marcador de peso molecular (100 pb; Gibco); Carril 12: ADN de *S. Enteritidis*. Carril 13: mezcla de reacción más 10 µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

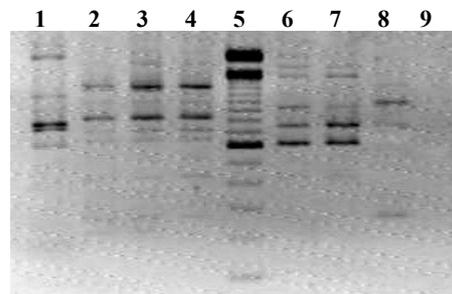


Figura 10. Fingerprints por RAPD-PCR de ADN (50 ng) de los serovares de colección y la cepa aislada, con el cebador OPB-15. Carril 1: Icterohaemorrhagiae Copenhageni; Carril 2: Australis Bratislava; Carril 3: Semarang Patoc; Carril 4: Pyrogenes Pyrogenes; Carril 5: Marcador de peso molecular (100 pb; Gibco); Carril 6: cepa aislada; Carril 7: Pomona Pomona; Carril 8: Sejroe Hardjo; Carril 9: mezcla de reacción más 10 µl de H₂O MQ sin ADN (control negativo).

Los **dos primeros** análisis por MAT de sueros del paciente luego confirmado como infectado por el serovar Pomona Pomona mostraron reactividad para varios serogrupos, y bajos títulos para Pomona. Sólo un **tercer suero** obtenido en fase convaleciente reveló un título de 800 para Pomona (**ver resultado más abajo**).

Resultado de la prueba MAT del paciente infectado por *L. interrogans* serogrupo Pomona, serovar Pomona.

Serogrupo	Serovar	Título 1.era muestra	Título 2da. muestra	Título 3.era muestra
Australis	Australis	negativo	50	100
Australis	Bratislava	50	400	400
Autumnalis	Autumnalis	negativo	negativo	50
Autumnalis	Butembo	negativo	100	100
Ballum	Castellonis	negativo	negativo	50
Batavie	Batavie	negativo	negativo	negativo
Canicola	Canicola	negativo	negativo	negativo
Celledoni	Celledoni	negativo	negativo	negativo
Cynopteri	Cynopteri	negativo	negativo	negativo
Grippotyphosa	Grippotyphosa	negativo	negativo	negativo
Hebdomadis	Hebdomadis	negativo	negativo	negativo
Icterohemorragiae	Copenhageni	negativo	100	100
Leptonema	Illini	negativo	negativo	negativo
Mini	Mini	100	1600	800
Pomona	Pomona	negativo	100	800
Pyrogenes	Pyrogenes	50	400	400
Sejroe	Hardjo	100	100	100
Sejroe	Sejroe	negativo	negativo	negativo
Sejroe	Wolfi	100	negativo	100
Samaranga	Patoc	negativo	400	800
Tarassovi	Tarassovi	negativo	negativo	negativo

En el marco del segundo trabajo de tesina de grado orientada en el laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene (Geymonat JP, 2011), los resultados de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termo-resistente (TR) sobre primeras muestras recibidas para diagnóstico, mostraron concordancia con la MAT en 86 muestras positivas de 127 (50 muestras ya positivas por MAT en primera muestra y 77 muestras que tuvieron un primer resultado negativo por MAT pero una segunda muestra con resultado positivo). También hubo concordancia en 146 muestras negativas de 171 confirmadas como negativas por MAT en 2 muestras. Se consideraron 41 muestras como falsos negativos y 25 muestras como falsos positivos (**tabla 3**). Las comparaciones se hicieron siempre sobre pacientes con ensayo completo de 2 muestras MAT.

Tabla 3 Resultado comparativo entre la MAT y la técnica de aglutinación macroscópica con TR con sueros positivos por MAT.

Aglutinación macroscópica con antígeno TR	Diagnóstico por MAT		Total
	Infectado	No Infectado	
Positivo	86	25	111
Negativo	41	146	187
Total	127	171	298

La sensibilidad de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno TR aplicada a una primera muestra de suero fue de 67,72% (intervalo de confianza 95%: 59,19 – 76,24) mientras que la especificidad de la prueba fue 85,38% (intervalo de confianza 95%: 79,79 – 90,97) (**tabla 4**).

La razón de verosimilitud para resultados positivos (RV+) fue de 4,63 y la razón de verosimilitud para resultados negativos (RV-) fue de 0,38. El Índice de Youden (IY) fue 0,53.

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,125 y el VPN fue de 0,999. Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes) el VPP fue de 0,450 y el VPN de 0,9375.

También se estimó la capacidad de la prueba de aglutinación macroscópica con TR para detectar precozmente infecciones que tuvieron primera muestra con resultado negativo por MAT y segunda muestra con resultado positivo por MAT (**tabla 4**).

Tabla 4. Resultado comparativo entre la MAT y la técnica de aglutinación macroscópica con TR con **primeros sueros negativos** por MAT de pacientes que fueron positivos en segunda instancia (seroconversión, infección aguda).

Aglutinación macroscópica con antígeno TR	Diagnóstico por MAT		Total
	Infectado	No Infectado	
Positivo	45	25	70
Negativo	32	146	178
Total	77	171	248

Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta prueba fue positiva en 58,44% de 77 pacientes cuya primera muestra por MAT fue negativa y la segunda muestra por MAT positiva.

La prueba de ELISA indirecta se aplicó en primera instancia al primer suero de los pacientes que tuvieron dos muestras negativas por MAT, con un intervalo entre ellas de 10 a 15 días aproximadamente. Esto permitió establecer el punto de corte (**cut-off**), estimado como la media de los negativos más dos desvíos estándar. La media de la absorbancia a 492nm del grupo control negativo fue de $0,25 \pm 0,15$. El punto de corte estimado que permitió establecer el límite de reactividad fue de 0,55.

Los sueros de pacientes positivos por MAT tuvieron una media de $1,88 \pm 0,61$.

La absorbancia de los sueros de pacientes con otras enfermedades (Hepatitis B y Sífilis) cayó por debajo del punto de corte, con una media de $0,21 \pm 0,12$. No se observó reacción cruzada con sueros de pacientes con Sífilis o Hepatitis B.

Los resultados de la prueba ELISA fueron coincidentes con la prueba MAT en 19 muestras positivas de 20 y en 23 muestras negativas de 24. Una muestra positiva no fue detectada por el ELISA y una muestra fue considerada como falso positivo (**tabla 5**).

Tabla 5. Resultado comparativo de las pruebas de ELISA y MAT.

ELISA	Diagnóstico por MAT		Total
	Infectado	No Infectado	
Positivo	19	1	20
Negativo	1	23	24
Total	20	24	44

La sensibilidad de la prueba ELISA fue de 95% (intervalo de confianza 95%: 82,95 – 100) mientras que la especificidad de la prueba fue 95,83% (intervalo de confianza 95%: 85,76 – 100).

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,412 y el VPN fue de 0,999. Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes), el VPP fue de 0,8008 y el VPN fue de 0,9908.

En el programa de evaluación del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para IgM específica, de los 161 sueros analizados por IFI-IgM, 97 correspondieron a pacientes con infección aguda y 64 a personas sin infección. De los 97, 51 mostraron resultados negativos por MAT en la primera muestra y en 46 el título de la primera muestra fue ≥ 400 para uno o más serovares.

Ninguno de los sueros obtenidos de pacientes con hepatitis por virus B ni con sífilis dio resultado positivo por IFI-IgM.

La sensibilidad y especificidad del ensayo de IFI-IgM para sueros de fase aguda fue de 79% y 100%, respectivamente. El valor predictivo positivo (VPP) fue de 100% y el valor predictivo negativo (VPN) no se calculó, ya que debido a la baja prevalencia los valores se modifican poco en función de los cambios de la sensibilidad. La IFI-IgM permitió hacer el diagnóstico presuntivo precoz de infección reciente analizando únicamente la muestra de suero obtenida en la etapa aguda, en 32 (62,7%) de 51 pacientes con infección aguda confirmada, pero resultado de MAT negativo en la primera muestra (la **figura 11 muestra un resultado positivo**).

El valor obtenido para el índice Kappa fue de 1.

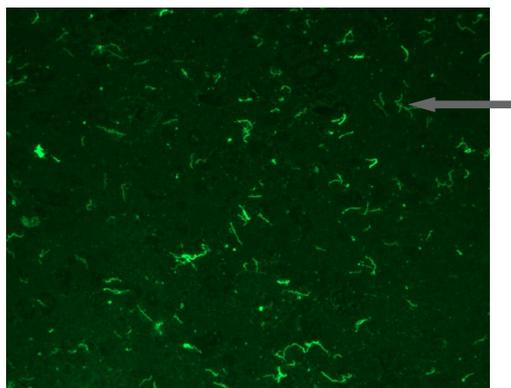


Figura 11. Imagen de IFI-IgM. Se observan las leptospiras de color verde manzana (algunas marcadas por la flecha gris) bajo microscopio de luz UV (200X) indicando un resultado positivo.

En el ensayo del **test inmunocromatográfico Aria-Leptospira IgG/IgM (COMBO RAPID TEST®)** (Iglesias T y col, 2018) éste resultó altamente específico para la detección de IgM (97%) y aunque tuvo una baja sensibilidad global (47%), permitió anticipar el resultado de MAT en 23% de los sujetos con Leptospirosis aguda confirmada. **En ninguno de los sueros analizados se obtuvo resultado positivo para IgG.**

En los ensayos de evaluación de la PCR en tiempo real para diagnóstico (González S y col, 2013), sólo 183 de los 235 pacientes tenían las 2 muestras de suero, aguda y convaleciente (obtenidas 10-15 días después) que pudimos analizar mediante MAT.

En 98 de 183 pacientes, los resultados de MAT fueron negativos (MAT -/-); 85 fueron positivos y respaldaron un diagnóstico de infección aguda (MAT +/-).

La qPCR pudo detectar hasta 10^2 leptospiras/ml en muestras de suero, plasma y sangre completa contaminadas y la detección se produjo antes (en ciclos más bajos) en el caso de muestras de suero contaminadas experimentalmente (**figura 12**).

Los sueros de 20 pacientes con sífilis, 15 con infecciones agudas de hepatitis B y 98 negativos en 2 ensayos MAT consecutivos fueron negativos por el ensayo de q-PCR (**especificidad 100%**). Todas las muestras fueron positivas para el gen *rnaseP* (valor de Tm entre 77 y 78 ° C). Sólo 26 sueros de fase aguda de los 85 (agudos negativos/positivos convalecientes) que fueron positivos por MAT fueron positivos por qPCR (**sensibilidad 30%**). Todos mostraron una Tm entre 84 y 85 ° C, correspondiente a la Tm esperada para el fragmento de amplificación del gen *LipL32*.

En los pacientes positivos por qPCR, la demora media entre la aparición de los síntomas y la colecta de la primera muestra fue de 8 días. Uno de estos pacientes falleció y otro mostró una enfermedad grave con deterioro de la función hepática y renal.

En pacientes con resultados negativos por qPCR pero positivos por MAT (n = 59), el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la extracción de la primera muestra fue de 13 días. Todas estas muestras mostraron resultados positivos para el gen *rnaseP*. Ninguno de estos pacientes murió y ninguno tuvo una enfermedad grave.

En concordancia con las estadísticas de los primeros 10 años, los pacientes de **sexo masculino** representaron más del 95% de los 85 casos confirmados de Leptospirosis por MAT y eran principalmente **trabajadores rurales de 20 a 40 años**. El 90% de los pacientes presentó fiebre, fatiga, mialgias y dolores de cabeza, mientras que la hiperemia conjuntival se observó solo en 30%.

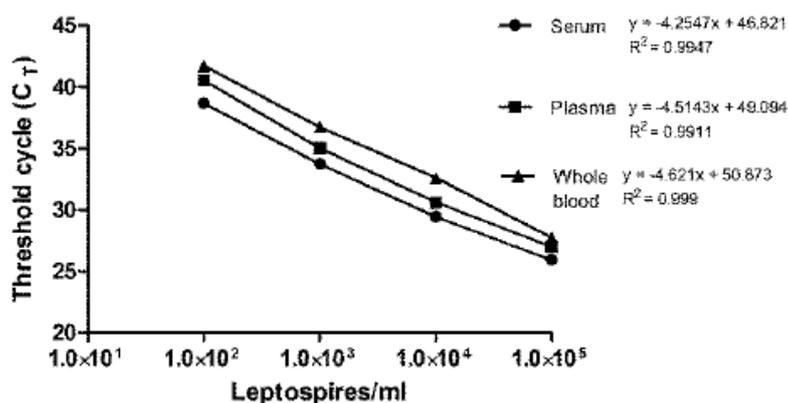


Figura 12. Límites de detección del ensayo lipL32 q-PCR utilizando ADN extraído de muestras de suero, plasma y sangre entera contaminadas con cantidades conocidas de *Leptospira interrogans* serovar Pomona cepa Pomona. Cada punto representa la media de 3 repeticiones de ensayos. Tomada de: **González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human Leptospirosis in Uruguay. J Infect Dev Ctries. 2013;7(12):941-945.**

Para la evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre Leptospirosis humana en Uruguay. (Arriola N y col, 2015), de 770 profesionales aleatorizados, al finalizar la etapa de recolección de datos, 76 médicos y 43 veterinarios completaron los requisitos necesarios para participar del estudio respondiendo de la forma estipulada el cuestionario.

La media de edad general de la muestra fue 47,5 años. La media de antigüedad en años de ejercicio de la profesión fue de 17,7 años para los médicos y 22,8 años para los veterinarios (**tabla 6**). 75% de los médicos, ejercía su profesión predominantemente en Montevideo y área metropolitana, mientras que 74% de los veterinarios encuestados lo hacía en el interior.

En cuanto a los conocimientos epidemiológicos sobre Leptospirosis humana, las respuestas sobre incidencia de la misma en Uruguay, sobre la mortalidad, sexo, edad y ocupación de la población afectada fueron en general coincidentes y correctas en ambos grupos de profesionales.

En ambos grupos los roedores fueron el reservorio más reconocido; los bovinos fueron identificados en gran proporción por veterinarios pero no por médicos, que en bajo porcentaje reconocieron a los animales de producción como posible reservorio de *Leptospira*, si bien la gran mayoría de los mismos mencionó a los trabajadores rurales como la ocupación de mayor riesgo (**tabla 7**).

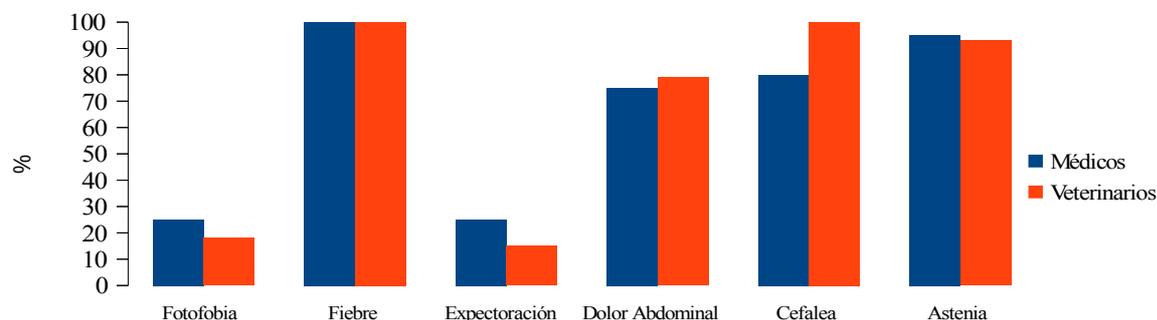
En cuanto al mecanismo de transmisión de la enfermedad, el 51,3% de los médicos respondieron que este se da a través de la orina y el 48,7% restante señaló un mecanismo no comprobado en la literatura. Por otra parte, los veterinarios respondieron de forma correcta y significativamente diferente en el 86,1% de los casos (**tabla 7**).

Las respuestas de médicos y veterinarios sobre sintomatología, diagnóstico y prevención son similares y revelan conocimientos en general adecuados, si bien los médicos reconocen en proporción mayor la tos y otras manifestaciones respiratorias como expresión posible de la enfermedad (**figuras 13 y 14**).

Tabla 6 . Características de la muestra analizada según edad y antigüedad en el desempeño profesional expresadas como media y desvío estándar.

	Médicos		Veterinarios		T	p
	Media	DE	Media	DE		
Edad	45,9	13,02	50,5	12,74	0,017	NS
Antigüedad	17,7	13,1	22,8	12,18	0,514	0,036

Figura 13. Sintomatología de la Leptospirosis. Porcentaje de médicos y veterinarios que a cada una de estos síntomas como manifestaciones de Leptospirosis.



Casi la totalidad de médicos (98,7%) y veterinarios (97,7%) señalaron a los **estudios serológicos** como los necesarios para confirmar el diagnóstico de Leptospirosis humana, siendo estos los estudios de referencia para el diagnóstico de la enfermedad.

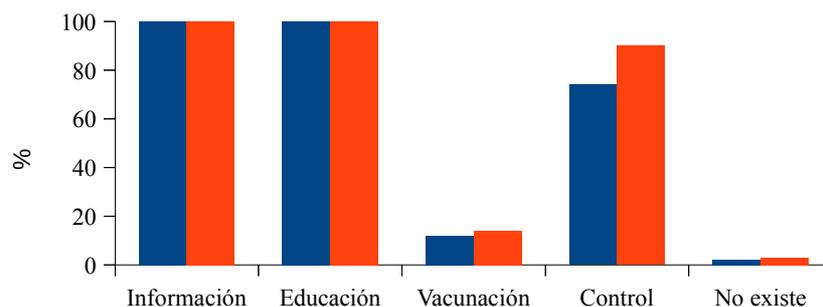


Figura 14. Prevención de Leptospirosis humana. Porcentaje de médicos y veterinarios que reconocen a cada una de estas medidas como aplicables al control y prevención de la Leptospirosis.

En la evaluación global de las respuestas brindadas por los profesionales, el puntaje medio obtenido en el score para el grupo de médicos y veterinarios fue de 12,08 y 13,01 respectivamente, sobre un máximo de 18 puntos. Al comparar estas medias con el estadístico *t* de Student, obtuvimos un valor *p* no significativo estadísticamente (**tabla 7**).

Tabla 7. Número de médicos y veterinarios que respondieron afirmativamente a cada opción, su porcentaje y valor *p* resultante de la comparación.

	Médicos (n= 76)	%	Veterinarios (n=43)	%	Valor <i>p</i>
Incidencia					
5	10	13,3	4	9,3	NS
15	34	45,3	11	22,5	0,038
50	22	29,3	17	39,5	NS
150	9	12	11	25,5	NS
Mortalidad anual					
< 10	49	64,47	22	51,16	NS
10-20	20	26,3	19	44,19	0,046
>20	7	9,2	2	4,65	NS
Población afectada					
Hombres	69	90,78	35	81,4	NS
Mujeres	1	1,32	2	4,65	NS
Niños	6	7,9	6	13,95	NS
Ocupación					
Trabajador rural	72	94,74	43	100	NS
Desocupados	3	3,95	0	0	NS
Estudiantes	1	1,32	0	0	NS
Médicos	0	0	0	0	NS
Reservorio					
Roedores	75	98,68	43	100	NS
Ovinos	6	7,89	16	37,21	<0,001
Bovinos	10	13,16	40	93,02	<0,001
Suinos	21	27,63	28	65,12	<0,001
Animales domésticos	18	23,68	32	74,42	<0,001
Aves	6	7,89	1	2,33	NS
Vías de transmisión					
Heces	33	43,42	1	2,33	<0,001
Orina	39	51,32	37	86,05	<0,001
Secreciones respiratorias	4	5,26	5	11,63	NS

Primera caracterización de cepas locales de origen humano y ambiental (Meny P y col, 2017).

Ocho hemocultivos fueron reconocidos como positivos en microscopio de campo oscuro en el período 2010-2016, y fueron confirmados con PCR de los genes *16S* y *LipL32* PCR como incluyendo cepas patogénicas de *Leptospira*. Procedían de trabajadores rurales, mayoritariamente de tambos localizados en departamentos del Sur del país. Tenían de 32 a 63 años de edad, y su evolución fue en general severa, con la sintomatología general común de fiebre, cefalea, artromialgias y astenia, más compromiso hepático y de otros parénquimas.

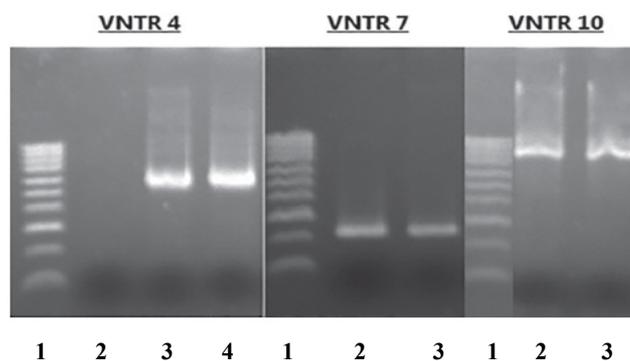
Los cultivos fueron habitualmente recuperados en ambos medios empleados (Fletcher y EMJH), y en 3 casos los ensayos de MAT fueron negativos, sin segunda muestra disponible. Cuando la MAT fue positiva, el serovar más reactivo no coincidió con el finalmente aislado.

Seis aislamientos pudieron ser caracterizados con MLVA-VNTR 4, 7 y 10, secuenciación parcial del gen *16S*, y análisis adicional por MLST y PFGE para dos de ellos (**figuras 15 y 16; tabla 8**). Además de la ya reconocida cepa *Leptospira interrogans* Pomona Pomona, se identificaron *L. interrogans* Pomona Kennewicki; *L. interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola o Portlandvere; *L. interrogans* serogrupo Sejroe, serovar Wolffii o Romanica, *L. kirschneri* Australis Ramisi y *L. kirschneri* serogrupo Pomona serovar Mozdok. No contando con antisueros absorbidos, para dos aislamientos no fue posible con los métodos disponibles diferenciar el serovar entre dos opciones. El análisis de las secuencias de amplicones de los 7 genes estudiados permitió asignar por MLST la cepa de serovar Kennewicki al ST 140, y la de serogrupo Canicola al ST 37. Un hemocultivo posterior permitió aislar una cepa adicional identificada como *L. borgpetersenii* Ballum Ballum (**tabla 8**).

Se han obtenido en total **9 aislamientos positivos de muestras ambientales**: dos de ellos de colecciones de agua en asentamientos montevideanos, uno de Isla de Lobos y 6 de establecimientos agropecuarios visitados para toma de muestras humanas o animales (**tabla 9**).

6 de ellas fueron identificadas como *Leptospira biflexa* por medio de reacciones positivas de PCR *16S* y *23S* que es propia de esta especie. Otra cepa con PCR para *16S* positivo fue identificada como *Leptonema illini* por secuenciación del amplicon obtenido. Finalmente, dos cultivos positivos en PCR *16S* pero negativos por PCR *23S* y *LipL32* PCR fueron caracterizados también por secuenciación del producto PCR como *Leptospira meyeri*, una especie saprofítica o parcialmente patogénica.

Figura 15. Ejemplo de resultados obtenidos mediante ensayos VNTR con el aislado humano AH2 correspondiente a *Leptospira interrogans* Pomona Kennewicki. VNTR 4: carril 1, marcador de ADN de 100 pb (Bioline, Meridian®; carril 2, control negativo; carril 3, aislado # AH2; carril 4, cepa IH23 *L. interrogans* Pomona Kennewicki. VNTR7: carril 1, marcador de ADN de 100 pb; carril 2, aislado # AH2; carril 3, cepa *L. interrogans* Pomona Kennewicki. VNTR 10: carril 1, marcador de ADN de 100 pb; carril 2, aislado # AH2; carril 3, cepa *L. interrogans* Pomona Kennewicki.



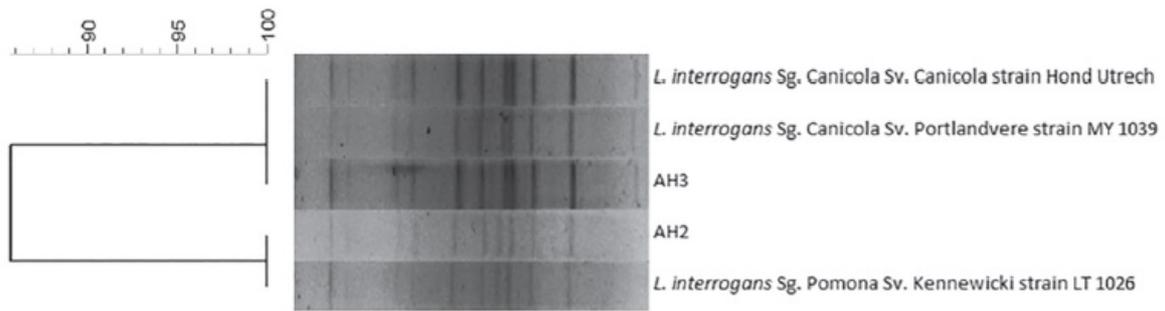


Figura 16. Imagen de *NotI*-PFGE y dendrograma que muestran que el patrón de la cepa **AH2** coincide con el de la cepa de referencia *L. interrogans* Pomona Kennewicki (P.K) y el patrón de la cepa **AH3** corresponde a los de *L. interrogans* Canicola Canicola (C.C) y Canicola Portlandvere (C.P).

Tabla 8. Características de los aislamientos de *Leptospira* de seres humanos.

ID de la cepa	Resultado MAT	PCR lipI32/16S	PCR 23S	MLVA	Patrón PFGE	ST	Secuenciación gen 16S	Identificación
AH1	+/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Pomona Pomona
AH2 *2	-/ND	+/+	NC	5-0-10	<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki	140	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Pomona Kennewicki
AH3 *3	-/ND	+/+	NC	1-10-3	<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola/Portlandvere	37	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Canicola Canicola/Portlandvere
AH4 *6	-/+	+/+	NC	3-2-11	NR	NR	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i> Sejroe Wolffi/Romanica
AH5*10	+/ND	+/+	NC	1-5-4	NR	NR	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. kirschneri</i> Australis Ramisi
AH6 *6	-/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. kirschneri</i> Mozdok ?
AH7	-/+	+/+	NC	NR	NR	NR	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i> Ballum

*Días transcurridos entre el inicio de los síntomas y la recolección de sangre para hemocultivo

Resultado MAT, primera muestra/segunda muestra

NC, no corresponde

NR, no realizado

ND, no disponible

Tabla 9. Características de los aislamientos de *Leptospira* recuperados de **muestras ambientales**.

ID de la cepa	Origen	PCR lipI32/16S	PCR 23S	Secuenciación gen 16S	Identificación
AA1	Agua de asentamiento	-/+	-	<i>L. meyeri</i>	<i>Leptospira meyeri</i>
AA2	Agua de asentamiento	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA3	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA4	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA5	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA6	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA7	Agua de tambo o granja rural	-/+	-	<i>L. meyeri</i>	<i>Leptospira meyeri</i>
AA8	Agua de tambo o granja rural	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>
AA9	Agua de pozo*	-/+	+	NR	<i>Leptospira biflexa</i>

* de la Isla de Lobos

El estudio de Leptospirosis en grupos humanos en riesgo incluyó a 308 personas: 300 integrantes de 5 grupos sociales en riesgo, y un pequeño grupo de 8 personas ("**otros**", **no expuestos**) que comprendía algunos miembros del personal de salud y algunos estudiantes o asistentes a las reuniones de intercambio. La distribución por sexo fue : 88 mujeres y 220 varones. Ciento treinta y nueve de los 300 sueros de personas en riesgo (46,3%: rango 41,1-64,0 en los diferentes grupos) reaccionaron con antígenos específicos en IFI-IgM y/o MAT (**tabla 10**), revelando así un posible contacto con *Leptospira*. La seroprevalencia en el grupo "**otros**" fue del 12,5%.

Los trabajadores de tambos revelaron una mayor frecuencia de reactividad serológica que la de los trabajadores de arrozales o los recicladores de residuos ($p < 0,05$).

Tabla 10. Sueros reactivos según IFI-IgM y / o MAT en hombres y mujeres de los diferentes grupos de riesgo.

Grupo estudiado	Reactivo por IFI-IgM o MAT		Total en el grupo		% de reactividad (IFI-IgM o MAT)	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujer	Hombre
Asentamientos	13	7	17	19	76,5	36,8
Recicladores de residuos	18	12	36	37	50	32,4
Trabajadores de arrozales	3	52	11	117	27,3	44,4
Tamberos	1	15	5	20	20	75
Veterinarios	10	8	16	22	62,5	36,4
Otros, sin factores de riesgo	1	0	3	5	33,3	0
Todos los grupos	45	94	35	215	52,9	43,7

Tabla 11. Sueros reactivos según IFI-IgM y/o MAT según la edad de las personas pertenecientes a los diferentes grupos de riesgo.

Grupo estudiado	Grupo etáreo (en años)				Totales	% de reactivos
	13- 29	30-49	50-73	Sin dato		
Asentamientos	11/18	4/10	3/5	2/3	20/36	55.5
Recicladores de residuos	11/22	12/33	4/13	3/5	30/73	41.1
Trabajadores de arrozales	15/36	31/60	9/28	0/4	55/128	43.0
Tamberos	3/3	6/10	5/9	2/3	16/25	64.0
Veterinarios	7/9	8/20	2/8	1/1	18/38	47.4
Otros, sin factores de riesgo	0/3	1/4	0/1	0/8	1/8	12.5
Todos los grupos	47/88	61/133	23/63	8/16	139/300	46.3

La reactividad de los sueros fue más frecuente cuando fue evaluada por IFI-IgM (124 de 300; 41,33%) que cuando fue estudiada por MAT (38 de 300; 12,66%) ($p < 0,05$). La reactividad por IFI-IgM fue especialmente frecuente en el suero de los recicladores de residuos, y los sueros IFI-IgM negativos/MAT reactivos se encontraron a menudo en trabajadores de arrozales. Solo un suero reactivo por MAT fue encontrado en recicladores de residuos.

Los serogrupos reactivos con mayor frecuencia fueron Icterohaemorrhagiae en trabajadores de tambos; Canicola en habitantes de asentamientos; Canicola, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae y Mini en trabajadores de arrozales; Pomona, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae entre veterinarios. La cepa de referencia Canicola

Canicola reaccionó con 15 sueros, Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae y Autumnalis Autumnalis con 12, Mini Mini con 11 y Pomona Kennewicki con 4.

Los sueros de las mujeres fueron más reactivos que los de hombres. Al estratificar el análisis por grupos, se encontraron algunas asociaciones significativas: mayor reactividad sérica de mujeres expuestas que los hombres entre los habitantes de asentamientos, y lo contrario en los trabajadores de tambos ($p < 0.05$ en ambos casos).

La edad de las personas estudiadas osciló entre 13 y 73 años (media = $38,3 \pm 13,3$).

El promedio de edad de los hombres (38,6) y las mujeres (37,4) no fue significativamente diferente cuando se examinó con la prueba "t". Sin embargo, fue diferente en los distintos grupos de riesgo. Los habitantes de los barrios marginales fueron los más jóvenes (media = 31,6), seguido por veterinarios (36,0) y luego recicladores (37,4). Los trabajadores de arrozales (40,2) y de granjas lecheras (44,0) tenían las edades medias más altas, estadísticamente diferentes de las de los habitantes de los barrios marginales. Análisis ANOVA de una vía: $p < 0,01$ con pruebas Duncan y Scheffé de comparación múltiple.

La mayoría de las personas analizadas y la mayoría de los sueros reactivos pertenecían a los grupos más jóvenes. El promedio de edad de 139 personas **en riesgo con sueros reactivos** ($X = 36,4$) fue ligeramente menor que la edad de los que dieron **resultados negativos** ($X = 39,8$) ("t" = 2,11; $p < 0,05$ para muestras independientes) (**tabla 11**).

Considerando los síntomas y signos de enfermedad experimentados en semanas anteriores, solo la **hiperemia conjuntival y las manifestaciones abdominales** (dolor, diarrea, vómitos, enfermedad hepática) fueron definitivamente más frecuentes en las personas que mostraban sueros reactivos que en las personas con resultado negativo ($p < 0,05$).

La encuesta detectó siete sueros altamente reactivos en MAT (**títulos ≥ 400**) de trabajadores que habían estado enfermos, o estaban actualmente enfermos, o desarrollaron posteriormente Leptospirosis clínica. Fueron identificados en dos lugares de trabajo: un campo de arroz (5 personas) y un tambo (2 pacientes). Todos fueron varones de mediana edad en contacto con bovinos y otros animales. Sus síntomas incluyeron: manifestaciones generales inespecíficas como fiebre, dolor de cabeza, astenia, dolor articular y muscular, con evidencia agregada de afectación del sistema digestivo o de los riñones en cuatro casos. Todos tenían servicios de atención de salud accesibles, pero el diagnóstico de laboratorio no se logró fácilmente.

El quince por ciento de las 300 personas potencialmente expuestas no recibió educación formal o no había completado primaria; el 67,2% había terminado la escuela primaria o no tenía educación secundaria completa; 5,5% había completado la educación secundaria o iniciado estudios universitarios; 14,7% tenían estudios universitarios terminados.

Más de la mitad de las personas estudiadas (55,7%) podría clasificarse como **de nivel socio-educativo bajo** (33,3%) **o medio/bajo** (22,4); el 21,3% de **nivel medio**; y casi un cuarto de ellos de **nivel medio/alto** (8,3%) **o alto** (14,7%). Las frecuencias de sueros reactivos no fueron estadísticamente diferentes entre los distintos niveles socio-educativos ($\chi^2 = 3,51$; $gl = 4$; $p > 0,05$). Tampoco se encontró asociación entre otros indicadores combinados y frecuencia de reactividad serológica.

Categorías del indicador combinado "nivel socio-educativo"	
Alto	Estudios universitarios completos.
Medio-alto	Educación secundaria completa o estudios universitarios incompletos. Con 2, 1 o 0 situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar Educación secundaria incompleta, sin situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en casa.
Medio	Educación secundaria completa o estudios universitarios incompletos. 3 situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar Educación secundaria incompleta. 1 o 2 situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar. Primaria completa o educación secundaria incompleta, sin situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en el hogar.
Medio bajo	Educación secundaria incompleta. 3 situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en casa. Escuela primaria completa con 1, 2 o 3 situaciones inadecuadas referidas a agua potable, roedores o pisos en casa.
Bajo	Escuela primaria incompleta o sin educación formal, o habitante de barrios marginales o trabajador de reciclaje de desechos.

Todos los veterinarios y los trabajadores de tambos tuvieron contacto con varios tipos de animales, principalmente bovinos. Los habitantes de barrios marginales y los recicladores de residuos tenían el mismo nivel de contacto, pero los animales involucrados fueron principalmente perros, caballos y roedores. Los trabajadores de los arrozales relataron contacto con una amplia variedad de animales, incluidos los ya mencionados y también con ovejas y cerdos, entre otros.

Todos los recicladores de residuos y los trabajadores de arrozales con sueros reactivos tuvieron contacto con animales; nueve y 19 respectivamente de aquellos con sueros negativos no lo tuvieron, lo que sugiere que el contacto con animales pudo estar relacionado con la reactividad ($p < 0,05$).

Considerando las 300 personas en riesgo encuestadas, el 49,3% de aquellos que tenían animales alrededor de sus hogares mostraron sueros reactivos; sin embargo, la reactividad fue del 34,3% en personas que no relataron contacto estrecho con animales ($p < 0,05$).

Los roedores estaban presentes en el entorno laboral o de vivienda de la gran mayoría de las 300 personas en riesgo. Los sueros fueron reactivos en el 49% de las personas que observaron roedores en su entorno, y 30,2% en personas que no lo hicieron ($p < 0,05$). Particularmente, 48,2% de los que declararon la presencia cercana de roedores en el lugar de trabajo tenían sueros reactivos, contra 30,4% de quienes afirmaron no trabajar cerca de los roedores ($p < 0,05$).

Los sueros de caballos fueron frecuentemente reactivos en las pruebas MAT, incluso en una mayor proporción que las muestras de perros (**tabla 12**, $p < 0,05$), especialmente en los arrozales. Canicola fue el serogrupo más frecuentemente reactivo en MAT de perros; Icterohaemorrhagiae en MAT de caballos.

Tabla 12. Resultados de MAT en muestras de suero obtenidas de perro y caballos

Situación	Perros			Caballos		
	Reactivo	No reactivo	Reactivo (%)	Reactivo	No reactivo	Reactivo (%)
Asentamiento	5	17	22.7	1	4	20.0
Arrozales	3	17	15	8	4	66.7
Tambos	0	8	0	2	3	40.0
Totales	8	42	16.0	11	11	50.0

La mayoría de los habitantes de barrios marginales y los recicladores de residuos (ambos mostraron sueros reactivos o no reactivos) utilizaron agua segura para beber y para otras actividades. Lo contrario ocurrió con

los trabajadores de los tambos.

Los veterinarios y los trabajadores de arrozales usaban uno u otro tipo de agua, pero en el último grupo, los trabajadores con sueros reactivos emplearon agua de fuentes inseguras con mayor frecuencia (50 de 55) que los trabajadores que mostraron resultados no reactivos (47 de 72) ($p < 0,05$).

Globalmente, 38,3% de las personas que utilizaron fuentes seguras de agua tuvieron sueros reactivos; las cifras fueron del 50,7% para aquellas personas que emplearon agua no potable de tanques, pozos o espejos de agua naturales. $\text{Chi}^2 = 4,14$ para 1 gl; $p < 0,05$.

Casi todos los trabajadores encuestados usaban zapatos o botas de seguridad, pero solo el 76% de ellos usaban guantes. Las diferencias en la reactividad no fueron significativas entre usuarios de guantes y aquellos que no los utilizaron.

La frecuencia de reactividad no fue diferente para las personas expuestas o no a fuentes de agua potencialmente contaminada, tanto en general como en cada grupo estudiado. Considerando los grupos por separado, la mayoría los habitantes de los barrios marginales estuvieron expuestos (92%) más que los miembros de los otros grupos en riesgo estudiados, que a menudo también estuvieron expuestos (47%) ($p < 0,05$).

Los sueros de personas que vivían en áreas expuestas a inundaciones fueron más frecuentemente reactivos que aquellas de personas que habitaban en zonas no inundables.

Para evaluar en profundidad los factores probablemente asociados con reactividad sérica (variable dependiente), se realizó un análisis de regresión logística final. Los resultados mostraron que las variables que se asociaron verdaderamente con la reactividad sérica fueron: 1 presencia de animales o contacto con ellos en el trabajo, en casa o su entorno: OR 4,96 (1,29-19,07 con 95% de confianza); 2 presencia de roedores o contacto con ellos en hogar, trabajo o su entorno: OR 2,79 (1,32-5,91); 3 uso de agua no potable para lavar y limpiar en el trabajo: OR 1,82 (1,10-3,01); y 4 exposición del hogar a inundaciones: OR 1,54 (1,01-2,055).

La probabilidad de tener un suero reactivo aumentó con la disminución de la edad: los sueros de los sujetos jóvenes tuvieron más probabilidad de ser reactivos. El anti-logaritmo del coeficiente Beta para edad fue 0,98 (límites con IC 95% = 0,96-0,998).

En este período de trabajo se obtuvieron seis aislamientos de *Leptospira* spp. de muestras de agua. Cinco fueron identificados como cepas no patógenas de *Leptospira biflexa*; y uno como *Leptospira meyeri*, como fue detallado más arriba.

La observación de los lugares, el intercambio de información y las charlas sobre prevención se realizaron con éxito en la mayoría de las visitas a los grupos en riesgo, dando continuidad a las actividades comunitarias de años previos. En general hubo una cálida bienvenida, apoyo y colaboración de parte de todos los participantes, y el hecho de hablar sobre la Leptospirosis, su epidemiología y factores de riesgo, dudas y miedos de las personas expuestas, signos y síntomas en pacientes enfermos y sujetos relacionados resultó útil tanto para los trabajadores como para el equipo de salud e investigación.

Los estudios del reservorio bovino de *Leptospira* mostraron cifras de seroprevalencia de anticuerpos por MAT iguales o superiores a 20% de los animales estudiados en diferentes oportunidades, con especial reactividad de los serogrupos Pomona y Sejroe (serovares Hardjo y Hardjo bovis). Más de 70% de los predios examinados mostraban algún animal positivo (Puentes R y col, 2011).

Se recuperaron numerosos cultivos positivos, de los cuales fue posible conservar para estudiar e identificar 20 aislamientos, la mitad de ellos procedentes de riñones u orinas de frigoríficos, y el resto de orina u órganos de animales muestreados en campo o autopsia, de rodeos presuntamente infectados según síntomas y signos clínicos, presencia de abortos, o por asociación con casos humanos confirmados.

El análisis de estos aislamientos, realizado con las técnicas y herramientas ya detallados, reveló que correspondían mayoritariamente a *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona, serovar Kennewicki, *Leptospira borgpetersenii* serogrupo Sejroe, serovar Hardjo bovis, o *Leptospira noguchii* serogrupo Autumnalis. Una cepa fue identificada como *L. interrogans* Canicola Canicola.

Las cepas recuperadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido, junto con las recuperadas de otros animales y de seres humanos (Zarantonelli L et al, 2018).

Resultados preliminares de análisis de Pinnípedos indican que 62,5% (30/48) de los sueros de animales adultos analizados mostró resultado positivo por MAT. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las 2 especies (lobos marinos *Arctocephalus australis* y leones marinos *Otaria flavescens*). Los serovares más frecuentemente reactivos fueron Pyrogenes, Canicola, Cynopteri y Australis, en ese orden.

Todas las 56 muestras de animales jóvenes Aa fueron negativas en muestras tomadas por dos equipos de trabajo en años diferentes.

Los datos en elaboración sobre Leptospirosis en equinos y referentes humanos muestran una seroprevalencia de anticuerpos con títulos ≥ 100 , reveladora de contactos infectantes, próxima a 45% en los animales, con diferencias según el grupo examinado: prevalencias inferiores en studs, y altas en equinos para faena.

Los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Ballum y otros fueron los más frecuentemente reactivos. Se ha confirmado hasta ahora solo un aislamiento positivo, identificado presuntivamente como *Leptospira interrogans*, serogrupo Louisiana.

En cuanto a referentes humanos, sólo se observó por el momento reactividad en dos trabajadores de establecimientos ganaderos, con títulos ≤ 200 , sin sintomatología asociada.

Los estudios en roedores revelan hasta el momento una frecuencia de anticuerpos en suero (con títulos ≥ 100) inferior a 10%, con reactividad predominante en MAT del serogrupo Icterohaemorrhagiae, y el aislamiento de dos cepas caracterizables de modo preliminar como del mismo serogrupo, característico de las especies de animales examinadas: *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*.

Se ha evidenciado por ahora un solo resultado positivo de PCR en tejido renal, pero dos ejemplares capturados en asociación con colonias de pinnípedos revelaron presencia de *Leptospira* en riñones, con técnica de inmunofluorescencia directa empleando conjugado policlonal de conejo anti-*Leptospira* (LEP-FAC *Leptospira* multivalent fluorescent antibody conjugate, rabbit origin, USDA, APHIS, VS, AMPS. IA 50010, USA).

Datos primarios sobre los estudios en perros revelan una seroprevalencia de infección variable según localización de muestreo, siendo máxima en perros de barrios periféricos y asentamientos de Montevideo (22.7%) y mínima en tambos, con escasas muestras. Los serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae fueron los principalmente reactivos, con frecuentes reacciones cruzadas para otros serogrupos.

Las **iniciativas más recientes** de investigación sobre Leptospirosis humana no tienen todavía resultados presentables, y sólo serán objeto de breves comentarios.

Discusión y conclusiones

De acuerdo con los objetivos de este trabajo, comentaremos en primer lugar la **metodología incorporada y evaluada** para el estudio de la Leptospirosis individual o grupal; en segundo lugar los resultados obtenidos sobre las **características clínicas y epidemiológicas de la infección**, y su vinculación con los conocimientos obtenidos sobre el reservorio animal; concluiremos en tercer lugar con **breves reflexiones sobre las líneas de pensamiento que guiaron la secuencia de las investigaciones**.

Sobre metodología y evaluación de procedimientos de estudio:

La técnica de micro-aglutinación MAT con cepas vivas de *Leptospira* fue incorporada con éxito en nuestro laboratorio, gracias al trabajo constante de técnicos dedicados a la difícil tarea de cultivo seriado, mantenimiento y verificación de la identidad de las cepas empleadas en el procedimiento. Los criterios de interpretación y títulos de corte definidos en ensayos preliminares probaron ser claramente efectivos en su aplicación diagnóstica. Durante años MAT ha sido la técnica de referencia que permitió el diagnóstico de cientos de casos, y contra la cual hemos evaluado métodos diversos de estudio rápido, sencillo o complementario.

Utilizada como única técnica permite en la práctica rutinaria el diagnóstico de la infección en sólo una minoría de los pacientes estudiados, porque debido al ascenso relativamente tardío de los anticuerpos aglutinantes (**figura 4**), requiere el envío de dos muestras; la segunda muestra es omitida en más de 50% de los casos por desconocimiento técnico, falta de interés que deriva de la buena evolución de los pacientes, dificultades de acceso o falta de colaboración de los mismos.

Por otra parte, con este procedimiento laborioso se obtienen resultados a veces tardíos que no contribuyen al manejo inicial de los pacientes.

Los serogrupos frecuentemente reactivos en las pruebas MAT realizadas para el trabajo diagnóstico **no deben considerarse como las variantes efectivamente responsables de las infecciones**. Estos no muestran de manera confiable la variante infecciosa de *Leptospira* porque existe una amplia reactividad cruzada en la fase aguda de la enfermedad (Scialfa E y col, 2010) (Smythe LD et al, 2009). La especificidad relativa de serogrupo de la respuesta de anticuerpos generalmente mejora en las muestras convalecientes tardías (**ver más arriba el resultado de la prueba MAT con la 3era. muestra del paciente infectado por *L. interrogans* serogrupo Pomona, serovar Pomona**). Hemos podido reconocer este efecto en muestras seriadas de algunos pacientes, y verificarlo comparando la breve serie de aislamientos humanos obtenidos con las variantes prevalentes en los resultados MAT (Meny P y col, 2017). Esto obliga a persistir en la tarea de cultivo e identificación de aislamientos (**práctica no desarrollada en el siglo XX en nuestro medio**) para conocer realmente las cepas circulantes y relevantes en términos epidemiológicos. El reconocimiento de las mismas permite además, como lo estamos haciendo, incorporarlas al panel de las cepas para diagnóstico por MAT y otras técnicas, mejorando de ese modo la sensibilidad de los métodos.

La frecuencia relativa de los serogrupos reaccionantes en los relevamientos serológicos humanos o animales, en cambio, puede orientar un poco más fielmente al conocimiento de las variantes circulantes, porque la MAT revela en estos casos una proporción probablemente importante de infecciones ya evolucionadas, en las cuales los anticuerpos de tipo IgG y también IgM persisten durante meses (**figura 4, figura 7**).

Reconociendo las limitaciones de la técnica descrita, se consideró conveniente trabajar para validar e instalar pruebas de mayor sensibilidad en etapas iniciales, mediante la detección de anticuerpos, antígenos leptospíricos o su ADN, que permitan un diagnóstico de la enfermedad en la primera etapa (**figura 4**), donde el tratamiento es más eficaz, mejora las posibilidades de curación del paciente y puede evitar la progresión a formas más severas.

Se ensayaron sucesivamente en nuestro laboratorio varios métodos de fácil ejecución para el diagnóstico indirecto precoz de la Leptospirosis humana, los cuales presentan adecuada *performance* y pueden ser utilizados como complemento para la MAT. Su utilidad en Uruguay no había sido previamente determinada (Maze MJ y col, 2019), (Hull-Jackson C et al, 2006).

La prueba de **aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente** es de utilidad para el diagnóstico rápido de Leptospirosis. Evita el manejo y mantenimiento de cultivos vivos de leptospiras, es de fácil ejecución y bajo costo ya que no requiere equipos, reactivos especiales, ni tampoco entrenamiento especial del personal técnico.

La macro-aglutinación resultó menos sensible que la MAT pero logró una **reacción positiva de forma más temprana**. Fue capaz de detectar cerca de 70% de las infecciones luego confirmadas por MAT, lo cual significa que tuvo una sensibilidad valiosa para el diagnóstico (**tabla 3**). Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta técnica fue capaz de detectar el 58,44% de 77 pacientes con infección aguda confirmada por 2 pruebas de MAT sucesivas (primera – y segunda+) (**tabla 4**).

La buena especificidad lograda (85,38%) está respaldada por el hecho de que no se obtuvieron reacciones cruzadas con los sueros de pacientes con otras enfermedades. Los altos valores de VPN obtenidos, señalan que al obtener un resultado negativo por medio de esta prueba, existe elevada probabilidad de que se trate de un paciente no infectado. Si bien los valores de VPP son aceptables, se podrían mejorar al aumentar la especificidad de la prueba, aumentando por ejemplo la pureza del antígeno utilizado o su composición con las cepas prevalentes en el medio.

La sensibilidad del ELISA en cambio fue muy elevada (95%) (**tabla 5**), lo cual sugiere que un resultado positivo en esta prueba, incluso si la MAT es aún negativa, puede ser de gran utilidad diagnóstica cuando solo se dispone de una muestra. Sumado a la **alta especificidad del ensayo (95,83%)** y el alto Índice de Youden registrado, esto respalda su utilidad. Los valores son incluso mejores que los revisados en la bibliografía para diseños similares (Rosa MI y col, 2017).

El resultado del ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto se pueda derivar la muestra a un laboratorio de referencia para confirmación por MAT. Esto constituye una ventaja de este ELISA respecto a la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, que proporciona mayor cantidad de resultados falsos negativos.

El ELISA fue claramente más sensible que MAT en etapas tempranas de la infección. Es fácil de estandarizar, los antígenos se pueden almacenar por mucho tiempo, no tiene casi ningún riesgo para el personal técnico y presenta pocas reacciones cruzadas con infecciones por otros gérmenes. La prueba de ELISA normalizado resultaría de gran utilidad en el tamizaje ante focos de Leptospirosis, por sus ventajas en cuanto a sensibilidad, posibilidad de automatización y de procesamiento de gran número de muestras simultáneamente y en corto tiempo.

Se está actualmente empleando con criterio cuantitativo y cualitativo en la evaluación de la respuesta inmune diferencial en ambos sexos.

En nuestro proyecto inicial, la técnica de inmunofluorescencia practicada mostró capacidad de revelar presuntas infecciones precozmente, pero su sensibilidad fue baja.

El método se ensayó nuevamente de modo organizado años después, para detección de IgM específica. **La IFI-IgM de elaboración propia** mostró una sensibilidad de 79% y una especificidad de 100% cuando se comparó con la MAT. Las cifras de especificidad (100%) y de VPP también fueron comparables con los datos obtenidos por otros autores, sugiriendo que la IFI-IgM **es una prueba útil para definir el diagnóstico y tomar decisiones terapéuticas cuando el resultado es positivo en la primera muestra de suero**.

(Pradutkanchana S et al, 2003). La IFI-IgM aparece como una herramienta válida para el diagnóstico temprano (etapa aguda, menos de diez días tras el inicio de los síntomas) de pacientes con Leptospirosis, sobre todo en aquellos con primera prueba de MAT negativa. Contando con la necesaria experiencia, capacidad técnica y criterio uniforme consideramos actualmente incorporarla como ensayo rutinario.

En cuanto a las desventajas: requiere para la lectura un microscopio de luz UV, como ocurre con la MAT; la IF no identifica los serovares involucrados, y **un resultado negativo no descarta la infección**. Teniendo en cuenta esto último, para descartar o confirmar la infección se requiere analizar por MAT una segunda muestra de suero obtenida a los 10-20 días de la primera.

En nuestro estudio de grupos humanos en riesgo (Meny P y col, 2019) se practicaron MAT e IFI-IgM en los sueros de las personas evaluadas, y se encontraron más sueros reactivos por IFI-IgM que por MAT. Este resultado no se puede explicar como causado por una baja especificidad de IFI, **ya que este método no mostró resultados falsos positivos en los ensayos anteriores**. Puede deberse a la baja sensibilidad conocida de MAT cuando se estudian infecciones recientes, o al uso de cepas vivas localmente no prevalentes como reactivos antigénicos, por lo cual se están incluyendo las cepas aisladas en el país en el panel MAT, para mejorar su rendimiento. La detección temprana de nuevas infecciones es más fácil con IFI-IgM que con MAT, y las infecciones recientes fueron al parecer especialmente frecuentes en algunos grupos expuestos como en los recicladores de residuos (30 por IFI de 30 reactivos, 29 de ellos no reactivos por MAT). En

sueros negativos por IgM IIF, se encontró reactividad MAT (que explora tanto IgG como IgM) en 10 trabajadores del campo de arroz y otros, hecho que puede interpretarse como revelador de contactos pasados o antiguos, con títulos de IgG persistentes.

El test inmunocromatográfico comercial evaluado es un procedimiento sencillo, rápido, útil para aplicar en el primer nivel de atención sanitaria, sobre todo en aquellas personas pertenecientes a los grupos de riesgo mencionados más arriba. Es necesario analizar una segunda muestra (obtenida 10-15 días después) cuando el resultado de la primera fue negativo. Debemos tener en cuenta la falla verificada del test ensayado para la detección de IgG anti-*Leptospira*, la cual determinará resultados falsos negativos, sobre todo luego de la fase aguda, cuando desaparezcan o disminuyan los anticuerpos de tipo IgM (**ver figura 4**).

El aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras clínicas y ambientales (Ifrañ S, 2006) (Meny P y col, 2017), (Zarantonelli L y col, 2018), primero humanas, luego animales, es de práctica reciente en Uruguay, tras un extenso período en el cual el conocimiento diagnóstico y epidemiológico de esta zoonosis se basaba únicamente en el estudio clínico y los métodos indirectos de análisis. Nuestro grupo ha informado los primeros resultados en el país de aislamiento e identificación de cepas infectantes, lo que representa una contribución y un avance sólido en la tarea de control de la Leptospirosis (**ver tablas 8 y 9**).

Respecto al aislamiento a partir de **hemocultivos humanos**, quedó demostrada su gran dificultad, y no aportó de manera sustantiva como método de diagnóstico temprano de la infección. Sin embargo, tiene mucho valor intentar el cultivo, sobre todo en laboratorios de referencia, para poder definir las características de las cepas circulantes y establecer vínculos epidemiológicos.

Los medios de cultivo utilizados permiten el crecimiento de microorganismos contaminantes, y esto representa un problema a la hora de realizar los aislamientos. Los microorganismos contaminantes (en este caso bacterias de la microbiota cutánea) compiten por los nutrientes, y su velocidad de duplicación es mayor que la de *Leptospira*. Además, en los procedimientos de filtrado por membranas de poro 0.22 µm para purificación, algunas variantes pueden ser retenidas.

Los medios empleados (principalmente Fletcher y EMJH) fueron igualmente efectivos en la obtención de aislamientos. El número de los mismos representó sin embargo poco más de 2% de las muestras analizadas; esta proporción no es satisfactoria, y puede ser probablemente mejorada con observación precoz, frecuente de los cultivos, y repetición de subcultivos para mantenimiento (Mgode GF y col, 2015), (Matthias MA et al, 2008), (Wuthiekanun V y col, 2007). El rendimiento relativamente escaso puede atribuirse en parte además a diferentes factores como anticoagulantes inapropiados, tratamiento intercurrente con antibióticos o extracción de sangre fuera del período leptospirémico inicial de 5-10 días. En adelante, una selección más estricta de muestras precoces puede mejorar la proporción de cultivos positivos, aunque quizá reduzca el número total de aislamientos obtenibles.

La mayoría de los pacientes que revelaron cultivos positivos eran mayores que el promedio de edad de los diagnosticados como infectados según MAT. Su enfermedad fue particularmente severa, con ictericia, disfunción orgánica e internación prolongada. Una alta carga bacteriana orgánica y circulante puede explicar estos hechos coincidentes. De 3 pacientes con hemocultivo positivo (y resultado obviamente diferido) se tuvo solo una primera muestra de suero para MAT y fue negativa, lo cual enfatiza la necesidad de bregar por el envío de dos muestras, y jerarquiza la importancia de los ensayos de tamizaje precoz para detección de IgM específica.

Los aislamientos humanos fueron diversos en nuestros estudios (**tabla 8**), y correspondieron a especies reconocidamente patogénicas. La expectativa respecto a los aislamientos ambientales (**tabla 9**) a partir de muestras de agua era identificar cepas saprofitas y también patogénicas, ya que fueron tomadas en sitios donde estas últimas circulan en seres vivos, y es conocida la capacidad de ambos tipos de cepas de sobrevivir de modo prolongado en el ambiente (Trueba G y col, 2004) (Mason MR et al, 2016) (Schneider AG y col, 2018). Sin embargo, fueron en general de la especie saprofita *L. biflexa*, con excepción de dos caracterizadas como *L. meyeri*. Estas son difíciles de clasificar, porque la especie incluye serovares patógenos como Sophia, saprófitas como Semaranga y otras como Perameles and Ranarum, que pueden encontrarse en ambos grupos, por lo cual vale la pena procurar su caracterización detallada con sueros absorbidos u otros procedimientos (Peláez Sanchez RG y col, 2016).

qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa, en tiempo real.

La complejidad y el comportamiento de la MAT y los cultivos nos llevó también a evaluar el rendimiento diagnóstico de técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de la infección temprana por *Leptospira*, en **fase de leptospiremia (figura 4)**. Estos métodos proporcionan un diagnóstico rápido y pueden ser positivos antes de la aparición de anticuerpos detectados por las pruebas MAT, IF o ELISA.

El ensayo qPCR mostró una alta sensibilidad analítica, detectando 10^2 bacterias por ml en el ADN extraído de muestras de suero, plasma o sangre completa inoculadas por nosotros con una cantidad conocida de bacterias viables (**figura 12**). Este valor es superior al informado previamente. (Stoddard RA et al, 2009). La sensibilidad de la qPCR para identificar a los individuos infectados **fue solo del 30%, valor menor que el de la MAT**. Si bien este hallazgo es consistente con reportes anteriores, nuestra cifra fue menor que los valores cercanos al 50% reportados por otros autores (Thaipadungpanit J y col, 2011), (Pérez J, Goarant C, 2010).

Esta baja sensibilidad diagnóstica puede deberse a varios factores: la mayoría de los casos de Leptospirosis son leves y desarrollan bacteriemia de $<10^2$ leptospiras/ml; las muestras a menudo se obtienen cuando hay anticuerpos presentes, varios días después del inicio de la enfermedad o después de iniciar el tratamiento con antibióticos. Se sabe que estos factores disminuyen las posibilidades de recuperar leptospiras de la sangre por cultivo, y también de obtener resultados positivos mediante métodos de amplificación de ADN *in vitro*. (Stoddard RA et al, 2009), (Thaipadungpanit J y col, 2011).

En la mayoría de los pacientes con reacciones MAT - / + y resultados negativos por qPCR (n = 59) habían transcurrido **más de 13 días entre el inicio de la enfermedad y la recolección de la primera muestra de suero (ver figura 4)**. Además, en muchos de estos pacientes la detección de anticuerpos IgM por ensayo de inmunofluorescencia fue positiva. Finalmente, las muestras que usamos habían sido congeladas y almacenadas a -20°C lo que podría disminuir el número de leptospiras detectables en las muestras. La qPCR nos permitió hacer un diagnóstico temprano y rápido en 26 de 85 pacientes (2 con enfermedad grave) antes de que pudiera obtenerse un resultado por MAT positivo. Además, el ensayo no dio ningún resultado falso positivo.

Este estudio sugiere que la qPCR es útil durante la primera semana de la enfermedad clínica y que las muestras de suero pueden ser mejores que las de sangre total para el diagnóstico.

La qPCR con SYBR green es un método rápido, específico y **menos costoso que el ensayo TaqMan** para su uso en laboratorios que procesan una cantidad relativamente grande de muestras y tienen limitaciones de financiación (Agampodi SB et al, 2012, (Bourhy P y col, 2011).

La identificación de los aislamientos recuperados fue posible con una combinación de técnicas moleculares, y podría precisarse más con sueros absorbidos no disponibles hasta el momento. **Fue cumplida con los procedimientos descritos más arriba en la Introducción-diagnóstico de laboratorio-métodos directos-amplificación de ácidos nucleicos-técnicas de fingerprinting- MLVA, RAPD-PCR, PFGE, MLST**. La técnica de RAPD-PCR fue la primera ensayada (Ifrañ S, 2006) y cumplió con las condiciones apropiadas para la caracterización de serovares de *Leptospira*. Se evaluaron cepas de colección y un aislamiento inicial, y se verificó que los patrones de bandas de amplificación eran idénticos o muy similares para algunos serovares, con determinadas condiciones y cebadores, pero eran claramente diferentes para otros, y era posible la caracterización precisa del aislamiento en estudio. Se observó que la técnica de RAPD-PCR fue reproducible para *Leptospira* ya que se obtuvo en sucesivos ensayos con un mismo cebador, el mismo perfil genético para cada serovar, y se concluyó que es un método simple, rápido y útil a la hora de caracterizar inicialmente una cepa aislada de *Leptospira*. Para su realización no se necesita la purificación de ADN, pero es necesario partir de un cultivo puro, condición que no es de sencillo cumplimiento.

Persistiendo en esta línea de trabajo, se ensayaron y pusieron en práctica luego otras técnicas de amplificación de secuencias repetitivas propias del género (MLVA-VNTR) (**figura 15**) (Meny P y col, 2017) que tienen más amplio respaldo de estandarización internacional, y otras técnicas de fingerprinting complementarias como PFGE (**figura 16**). Fueron aplicadas al estudio de otras cepas de origen humano, y de los aislamientos obtenidos en vacunos y otros animales, como fue más arriba descrito.

Sin perjuicio del valor y la importancia epidemiológica del trabajo cumplido, el aislamiento y la identificación en Uruguay de las cepas circulantes de *Leptospira* en personas, animales y ambiente debe ser continuada, multiplicada y perfeccionada, con el fin de obtener un panorama confiable sobre la distribución y

difusión de las variantes bacterianas, para guía consecuente de diversas acciones preventivas.

Sobre características clínicas y epidemiológicas de la Leptospirosis humana, y su vinculación con el reservorio animal en sus principales componentes.

A comienzos de siglo, la Leptospirosis humana probablemente no era una enfermedad realmente emergente en Uruguay, sino una infección desatendida, favorecida por el contacto estrecho entre seres humanos y animales, derivado de condiciones sociales y económicas (Repiso y cols., 2005).

Actualmente se define como una enfermedad endémica con 50-100 casos detectables por año, con brotes esporádicos cada cierto tiempo. (https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/buscar?search_api_fulltext=+DEVISA+Div.+Epidemiologia+&search-in-site=MSP)

Antes del año 2000, las infecciones por leptospiras eran una preocupación para veterinarios y personas involucradas en la producción de carne y lácteos, debido a frecuentes abortos bovinos, disminución de la producción de leche y pérdidas económicas.

Las herramientas de diagnóstico estaban diseñadas para detectar infecciones animales, pero no estaban disponibles en la mayoría de los centros de salud para el estudio de los casos humanos. La MAT para sueros humanos se practicaba en los laboratorios de DILAVE (Dirección de Laboratorios Veterinarios, MGAP), cuyos técnicos promovieron nuestra inclusión en el tema.

Los casos informados eran escasos y la letalidad aparente era alta, probablemente porque sólo los casos severos fueron identificados, atendidos y denunciados (Lombardi R y col, 1972), (Ursu M, Lombardi R, 1993), (Lombardi R, 1997). En 1998, se registraron 13 casos humanos y tres muertes por el Departamento de Epidemiología (MSP); en 1999, ocho pacientes con Leptospirosis y sin muertes.

La vigilancia y registro de casos, la preocupación de los trabajadores de la salud, la detección de infecciones menos graves, la promoción y difusión de información sobre el tema y la amplia oferta diagnóstica han contribuido al mejor conocimiento de esta infección, al diagnóstico en etapas precoces de la evolución clínica y a una reducción significativa de la mortalidad en nuestro medio (Filippini M y col, 2002).

Sin embargo, y aunque publicaciones locales han informado de casos de Leptospirosis que muestran manifestaciones respiratorias, neurológicas o incluso abdominales y otros signos y síntomas, su presencia ha sido y es actualmente causa de fallas diagnósticas. El personal sanitario y especialmente los médicos debemos avanzar en el reconocimiento de las manifestaciones proteicas de la Leptospirosis, y en la relación clínica de las presentaciones con la evolución más probable de los pacientes (Breijo M y col, 2006), (Pisano I et al, 1997), (Filippini M y col, 2003), (Smith S y col, 2019).

Más en general, el conocimiento sobre esta zoonosis, su epidemiología, su manejo, tratamiento y prevención están todavía insuficientemente difundidos entre el personal de Salud y sus distintos técnicos, constituyendo un deber pendiente de la Facultad de Medicina, de la UdelaR y del propio Sistema de Salud. Esto motivó la encuesta que hemos expuesto, realizada en 2015 por un grupo destacado de estudiantes de medicina, que verificó un nivel general de saberes satisfactorio de médicos y veterinarios sobre la leptospirosis, pero una dificultad de parte del grupo de médicos para reconocer la diversidad del reservorio de riesgo, y para definir las vías de transmisión de la infección al ser humano.

Los resultados que presentamos sobre la situación de esta zoonosis en nuestro país se basan principalmente en MAT (WHO-ILS, 2003). Revelan un promedio de 90 a 100 infecciones confirmadas por año. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por IFI-IgM la cifra real podría ser superior a 120 casos anuales.

Considerando que la población total del país era de aproximadamente 3.350.000 habitantes, que no todos los pacientes se estudian o notifican, y que muchos casos leves generalmente ocurren por cada persona abierta o clínicamente enferma, pudimos estimar que al menos 500 infecciones humanas pudieron desarrollarse anualmente en Uruguay: una incidencia de Leptospirosis humana de aproximadamente 15 casos/100.000 habitantes/año (INE, 2011). En comparación con estimaciones similares en otros países, esta representó una cifra alta para Uruguay (Jansen A et al, 2005) (Vieira ML y col, 2006) (Schneider MC et al, 2017).

La variación anual de la tasa de incidencia estuvo estrechamente relacionada con el clima, la lluvia y las inundaciones que favorecen la diseminación de gérmenes de procedencia urinaria (**figura 5**), y que explicarían los picos de 2002-3, 2007, 2010 y 2014 por ej, pero otros factores también son importantes. En 2004 y parte de 2005 las cifras de precipitaciones fueron elevadas, aunque la incidencia cayó abruptamente, quizá porque en 2002, la crisis económica regional llevó a que los productores rurales sacrificaran los

animales más viejos, disminuyendo así de manera importante el volumen del reservorio animal. Doce millones de bovinos y 9,5 millones de ovinos rumiantes vivían en campos uruguayos en 2008 en asociación con una gran población de perros (aproximadamente 1,2 millones) unos 350000 equinos e innumerables roedores de diversas especies. La frecuencia de infección es probadamente alta para bovinos y equinos, aunque resta confirmar la prevalencia en otras especies. El componente bovino del reservorio de *Leptospirosis* ya ha sido estudiado, a nivel local y mundial, y se ha reportado su importancia en Uruguay (Repiso MV y col, 2005), (Puentes R et al, 2011), (Zarantonelli L y col, 2018). La eliminación de *Leptospira* a partir de la orina de estos animales infectados, y el contacto frecuente con ellos declarado por los pacientes positivos orientan a considerar su relevancia en el origen de las infecciones humanas. La distribución territorial de las mismas y la observación de las condiciones de vida y de trabajo de la población rural afectada (por ejemplo: falta de protección adecuada de los trabajadores jóvenes en tambos y predios ganaderos, exposición a la orina animal, a fetos abortados y tejidos reproductivos infectados, eliminación del agua de lavado de áreas de trabajo a colecciones próximas de agua, favoreciendo la recirculación de bacterias) **conducen a señalar a los animales de producción, especialmente bovinos como la principal fuente directa de Leptospirosis humana en nuestro país.** La exposición de los trabajadores es especialmente importante en **granjas lecheras**, como lo confirma la elevada seroprevalencia de anticuerpos específicos hallada en este grupo humano de riesgo, y también en otros trabajadores rurales como los arroceros.

Nuestros resultados de estudio de grupos humanos en riesgo (Meny P y col, 2019) confirman que el contacto de humanos con animales es un factor de riesgo importante para desarrollar infección por *Leptospira*, al menos en algunos grupos sociales definidos. La mayoría de los miembros de los grupos humanos estudiados (trabajadores de tambos, del arroz, recicladores de residuos urbanos, veterinarios, habitantes de asentamientos) estuvieron expuestos a varios de los factores de riesgo conocidos. La **exposición directa o indirecta a animales** y el **uso de agua no-potable** fueron las condiciones más relevantes asociadas con la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*.

Los títulos frecuentes de Canicola en los habitantes de los barrios marginales coincidieron con los de la población cercana y numerosa de perros que viven en dicho entorno.

La reactividad de los **sueros equinos estudiados fue alta** (50%) (**tabla 12**) en este programa de estudio, y también en nuestros datos preliminares de una encuesta más completa. El serogrupo Icterohaemorrhagiae fue el más frecuentemente reactivo en sueros de caballos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos regionales. Las infecciones y enfermedades de los caballos generan preocupación entre los criadores y propietarios. La enfermedad equina y el papel local de los caballos en la transmisión de *Leptospira* deben ser estudiados más a fondo (Khurana SK y col, 2016), (Pinto S et al, 2017).

El contacto con roedores también fue identificado como un factor de riesgo importante para los grupos humanos estudiados, y puede serlo para otros animales, como lo sugieren nuestros datos y los expresados en la literatura internacional (Guernier V y col, 2018) (Fischer S et al, 2018) (Cosson JF et al, 2018), aunque los roedores no siempre se reconocen como reservorio relevante de estas infecciones (Biscornet L et al, 2017), (Loan HK et al, 2015), (Allan KJ y col, 2018).

En nuestro medio, las ratas (y en parte los perros) son habitualmente culpados como fuente de *Leptospirosis* humana por el personal de salud (Arriola N y col, 2015) y por la población en general, que no identifican otros animales de producción o domésticos como posible origen de infección en los cuales enfocar necesarias medidas preventivas. Sin embargo, y si bien no es posible ni prudente minimizar la participación de estos roedores en la difusión de la *Leptospirosis*, ésta no parece ser en nuestro medio “la enfermedad de la rata”, como es frecuente creer. La asociación más frecuente con la infección humana parece ser el contacto con animales de producción, especialmente bovinos.

Aunque resta estudiar de modo extenso las especies de roedores en el medio rural, datos preliminares en área metropolitana señalan reducida seroprevalencia de anticuerpos en las mismas, e indican contacto y excreción de serogrupos no aislados localmente hasta el momento en infecciones humanas; principalmente Icterohaemorrhagiae, como en roedores urbanos y suburbanos de Brasil, Argentina y en todo el mundo (Scialfa E y col, 2010), (de Faria MT et al, 2008), (Boey K y col, 2019). Este serogrupo es considerado el principal causante de las infecciones graves por *Leptospira* en el ser humano, pero no ha sido aislado hasta el momento de los casos humanos en Uruguay, casos que ocurrieron en pacientes estrechamente vinculados a la población bovina en tambos y predios rurales. Si se obtuvieran en adelante más aislamientos humanos y más cultivos de casos urbanos, quizá correspondieran en parte a esta variante procedente de roedores u otros animales. En el reducido conjunto de casos urbanos anuales no hay reactividad predominante en MAT para

este serogrupo, pero es sabido que este dato no es confiable para distinguir la variante infectante. La reactividad para Icterohaemorrhagiae era sin embargo elevada en el relevamiento de contactos de grupos humanos en riesgo, que detectaba anticuerpos de probable alta afinidad de serogrupo.

Por el contrario, *Leptospira interrogans* Pomona Kennewicki y Canicola han sido aislados en infecciones bovinas y humanas, con perfiles genéticos parciales idénticos. Hay que señalar, no obstante, que hay variantes aisladas en infecciones bovinas (*L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo y *L. noguchii*) que no han sido recuperados hasta el momento en infecciones humanas, y que lo inverso ocurre con aislamientos humanos (*L. kirschneri*, por ej) no cultivados en muestras bovinas.

La identificación de cepas humanas de *Leptospira* no ha sido publicada con frecuencia en informes de países vecinos. *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ha sido habitualmente identificada en centros urbanos de Brasil (Pereira MM et al, 2000). Otras especies y serovares son probablemente comunes en áreas rurales y otras de Brasil, incluyendo *L. noguchii* (Silva EF y col, 2009) y *L. kirschneri* (da Cunha CE y col, 2016) (Balassiano IT, 2017). *L. santarosai* ha sido aislada en Colombia y países vecinos (Peláez Sanchez RG et al, 2016). *Leptospira interrogans* serogrupos Canicola, Sejroe, Icterohaemorrhagiae y otros han sido aislados de seres humanos en Argentina (Chiani Y et al, 2016).

En cuanto a los serogrupos bovinos aislados e identificados, *L. interrogans* Pomona Kennewicki es un patógeno animal reconocido al igual que *L. borgpetersenii* Sejroe Hardjo, del cual los vacunos son hospederos de mantenimiento, pero *L. interrogans* Canicola Canicola en cambio ha sido sólo identificado en nuestros estudios y en la región como variante infectante en carácter incidental. Merece especial atención el aislamiento reiterado de *L. noguchii*, que advierte sobre la circulación en nuestro medio de una especie no previamente reconocida, que hay que incorporar de modo estable en las técnicas de diagnóstico indirecto como MAT, que hay que tener en cuenta en la formulación de vacunas al igual que el serovar Kennewicki, y cuyo comportamiento como patógeno en la amplia población bovina nacional, y su posible transmisión al ser humano deben ser objeto de detallado estudio y vigilancia.

Todos los factores de riesgo prevalentes identificados deben ser considerados para diseñar programas de prevención efectivos. El contacto frecuente con animales de producción, principalmente bovinos, con caballos y perros empleados como auxiliares laborales están estrechamente relacionados con las actividades económicas nacionales predominantes, y parece ser la principal razón que explica la incidencia relativamente alta de Leptospirosis en los trabajadores rurales de Uruguay. Las malas condiciones ambientales y sociales, junto con el contacto con perros, equinos y roedores, son también factores de riesgo importantes en algunos grupos humanos suburbanos y además en entornos rurales.

Los limitados resultados obtenidos sobre la vinculación de las infecciones humanas con las correspondientes al reservorio animal en nuestro medio proveen orientaciones importantes de conocimiento, pero muestran también que falta mucho por saber y que se requiere profundizar en la investigación epidemiológica, el aislamiento más numeroso y la comparación de cepas humanas y animales, para colocarse en condiciones de diseñar medidas preventivas más eficaces de control de la difusión de esta zoonosis, con enfoque **Una Salud**. (Guernier V y col, 2018), (Loureiro AP et al, 2020), (Schelotto F y col, 2013).

Nuestro equipo ha desarrollado durante años una campaña de información y educación en pequeños poblados, empresas rurales, tambos, centros educativos, profesionales y sanitarios, organizaciones comunitarias e incluso en servicios de educación superior (González S, del Monte A, 2008), para contribuir al mejor conocimiento y alerta sobre esta zoonosis, su prevención, diagnóstico y manejo. Se requiere difundir la necesidad de medidas preventivas para la protección de los grupos en riesgo, mediante equipo adecuado de protección personal (guantes, botas, etc), información, educación, e inmunización vacuna, que indirectamente protege la población humana, como fue demostrado en Nueva Zelanda (Thornley CN et al, 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro relevamiento serológico sugieren que los seres humanos pertenecientes a todos los grupos en riesgo estudiados estuvieron ampliamente expuestos a la infección por *Leptospira*. El porcentaje de muestras que revelaron anticuerpos fue superior al 40% en todos los grupos examinados (**tabla 10**). Como se esperaba, la seroprevalencia fue menor entre otras personas no expuestas a factores de riesgo conocidos de infección, cuyas muestras se obtuvieron ocasionalmente. Resultados similares se han reportado en encuestas regionales e internacionales (Escandon-Vargas K y col, 2017) (Parveen SMA et al, 2016).

La incidencia mayor de la Leptospirosis en varones es un hecho conocido y presente en todo el mundo. Se atribuye habitualmente al diferente perfil ocupacional de uno y otro sexo, y a las actividades predominantemente peridomiciliarias de las mujeres (Costa F y col, 2015). En Uruguay, las características laborales de los trabajadores rurales infectados parecen respaldar esta noción; sin embargo, nuestros relevamientos sero-epidemiológicos sobre grupos sociales en riesgo revelan que las mujeres tienen contacto frecuente e infección por *Leptospira* (**tabla 10**), aunque no se enfermen en proporción similar a las infecciones (Meny P y col, 2019). Estudios más recientes, respaldados en experiencias con animales, parecen confirmar que la resistencia a la enfermedad (aunque no a la infección) es mayor en el sexo femenino, y probablemente en niños (Gomes CK et al, 2018).

Hay otras publicaciones que informan como la nuestra sobre frecuencias de infección (no enfermedad) similares o mayores en mujeres que en varones (Pedraza AM y col, 2012) (García Masaya ML y col, 2013) (Escandón-Vargas K y col, 2017). Existe también bibliografía consultable sobre respuesta inmune diferencial de unas y otros a las infecciones virales, bacterianas y parasitarias, con mayor resistencia de las mujeres a la enfermedad, asimetría que se atribuye a efectos hormonales o a factores codificados en secuencias genómicas distintas según sexo (Klein SL, Roberts CW, Eds, 2010) (Schurz H et al, 2019) (Giefing-Kroll C y col, 2015). La mayor severidad de las infecciones por *Leptospira* en varones podría deberse a una menor capacidad de desarrollo de la respuesta inmune innata, lo cual impide un efectivo control temprano de la infección, seguido de una activación reducida de la respuesta inmune adaptativa, con proliferación microbiana en los tejidos y progreso de la enfermedad (Chin VK et al, 2018).

Alternativamente, la baja incidencia de Leptospirosis clínica detectada en mujeres, a pesar de la infección frecuente, puede ser el resultado de un sub-diagnóstico de la enfermedad o una demanda limitada de atención por parte de las pacientes. Esta explicación no está actualmente respaldada por pruebas existentes; sin embargo, merece un examen más detenido.

Es necesario analizar en detalle si los factores ligados al género están vinculados al desarrollo de enfermedad clínica. La respuesta del huésped está involucrada en la patogenia de esta enfermedad; puede comportarse de manera diferente en hombres o mujeres, así como en hombres jóvenes o pacientes ancianos. (Zuerner RL, 2015).

Los contactos infecciosos se detectaron con mayor frecuencia en los miembros jóvenes de todos los grupos de riesgo (**ver tabla 11**) (Meny P y col, 2019) y en los casos con diagnóstico confirmado suele ocurrir una distribución por edades similar (Schelotto F y col, 2012). Los niños rara vez muestran enfermedad. La Leptospirosis fue menos frecuente en los grupos de edad avanzada, al igual que la reactividad sérica detectada, pero los casos graves ocurren con mayor frecuencia en los trabajadores mayores (Costa F et al, 2015), (Meny P y col, 2017) (Schelotto F y col, 2012).

Los niños se reconocen poco frecuentemente enfermos, y se supone que es por estar menos expuestos en general, excepto a los perros y roedores en entornos urbanos o rurales poco favorecidos (Tealdo MS y col, 2007), pero corresponde también revisar estos criterios con datos concretos de contactos, infección y enfermedad. Se necesita en suma más información sobre la presencia y transmisión de la Leptospirosis en mujeres y niños, que rara vez se reconocen como infectados por razones que deben ser especialmente exploradas (Guerrier G et al, 2013).

Sobre la secuencia, pasada, presente y futura, de las investigaciones.

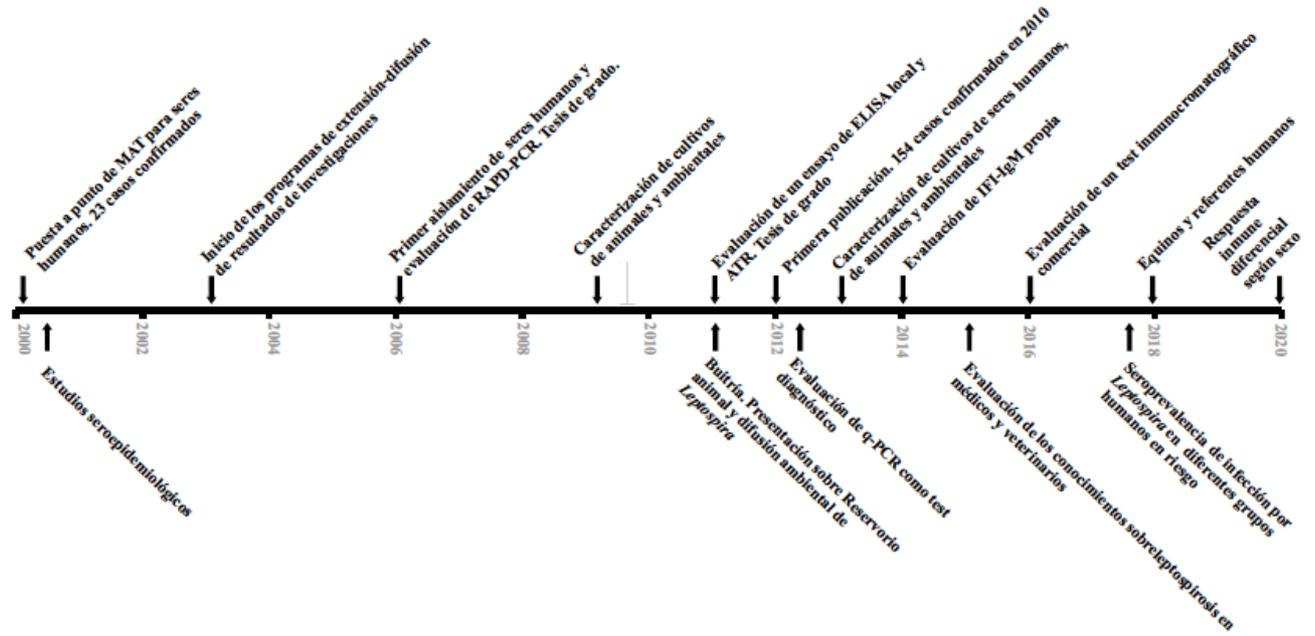
El trabajo que aquí se informa constituye una combinación de tareas de apoyo a la atención de salud, creación de conocimientos, formación de recursos humanos y su difusión por medio de actividades de enseñanza y extensión, como corresponde a todo equipo técnico y docente universitario del área de la Salud. El objetivo inicial de respaldo diagnóstico y desarrollo de conocimientos clínico-epidemiológicos sobre la Leptospirosis humana, requirió la incorporación y validación de herramientas y métodos diversos y la organización de una extensa red de colaboraciones interinstitucionales e interdisciplinarias que facilitaron la tarea. Dio lugar a resultados que incluyeron el descubrimiento de nuevas incógnitas a develar sobre el reservorio animal, las condiciones de riesgo de diversos grupos humanos y otras, en una secuencia que creemos inconclusa e interminable de conocimientos obtenidos que revelan nuevos aspectos y áreas de lo que falta saber y perseguir en etapas sucesivas de investigación.

El camino próximo exige reforzar la formación de técnicos e investigadores, la difusión de conocimientos a todos los niveles, y la búsqueda de otros, nuevos, detectados como necesarios.

- El seguimiento a largo plazo de la evolución de los enfermos conocidos;
- el estudio detallado de otros grupos de riesgo
- el análisis de la respuesta inmune diferencial en ambos sexos;
- el más amplio aislamiento de cepas obtenibles del ambiente y de personas o animales infectados;
- el desarrollo y validación de procedimientos sencillos de diagnóstico empleables en los primeros niveles de atención;
- y la creación de conocimientos y productos que faciliten la necesaria elaboración de vacunas realmente efectivas (Felix CR y col, 2019) (Nagel A y col, 2019) (Fernandes LGV y col, 2019) superando las presentes formulaciones diversas basadas en bacterias inactivadas,

constituyen metas actualmente identificables de un proceso de conquista progresiva y en etapas de lo no-sabido, que no debe tener fin.

Línea del tiempo



Referencias

- Adler B. (2015). Vaccines Against Leptospirosis. pp. 251–272 in: Adler B., editor. *Leptospira* and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology 387. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8.
- Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM (2012) Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis* 54: 1249-1255. doi: 10.1093/cid/cis035.
- Agudelo-Flórez P, Londoño AF, Quiroz VH, Angel JC, Moreno N, Loaiza ET, Muñoz LF, Rodas JD. (2009). Prevalence of *Leptospira spp.* in urban rodents from a groceries trade center of Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 81: 906–910. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0195.
- Ahmed N, Devi M, Valverde MA, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5:28. doi:10.1186/1476-0711-5- 28
- Allan KJ, Halliday JEB, Moseley M, Carter RW, Ahmed A, GorisMGA, Hartskeerl RA, Keyyu J, Kibona T, Maro VP, Maze MJ, Mmbaga BT, Tarimo R, Crump JA, Cleaveland S. (2018). Assessment of animal hosts of pathogenic *Leptospira* in northern Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* Jun 7; 12(6): e0006444. doi: 10.1371/journal.pntd.0006444.
- Aricapa HJ, Pérez JE, Cabrera IC, Rivera K. (2008). Valoración de la respuesta de anticuerpos tipo IgM e IgG frente a *Leptospira* en bovinos. *Bio salud* 7(1): 29-39.
- Arriola N, Berois D, Jeldres M, Lara F, Leites M. (2015). Evaluación comparativa del conocimiento del personal médico y veterinario sobre leptospirosis humana en Uruguay, julio-setiembre 2015. Monografía para el Ciclo de Metodología Científica II de la carrera de medicina, UdelaR.
- Balassiano IT, Vital-Brazil JM, Ramos TMV, Timm LN, Pereira MM. (2017). Molecular and serological characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Pomona isolated from a human case in a Brazilian rural area. *Rev Soc Bras Med Trop.* 50: 396-398. doi: 10.1590/0037-8682-0445-2016.
- Bertasio C, Boniotti MB, Lucchese L, Ceglie L, Bellinati L, Mazzucato M, Furlanello T, D'Incau M, Natale A. (2020). Detection of New *Leptospira* Genotypes Infecting Symptomatic Dogs: Is a New Vaccine Formulation Needed? *Pathogens.* Jun 18;9(6): 484. doi: 10.3390/pathogens9060484.
- Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M. (2004). Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995-2002. *J Clin Microbiol.* 42: 1155-1162. doi: 10.1128/jcm.42.3.1155-1162.2004.
- Biscornet L, Dellagi K, Pagés F, Bibi J, de Comarmond J, Mélade J, Govinden G, Tirant M, Gomard Y, Guernier V, Lagadec E, Mélanie J, Rocamora G, Le Minter G, Jaubert J, Mavingui P, Tortosa P. (2017) Human leptospirosis in Seychelles: A prospective study confirms the heavy burden of the disease but suggests that rats are not the main reservoir. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(8): e0005831. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005831>
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* Dec; 3(12): 757-771.
- Boey K, Shiokawa K, Rajeev S. (2019). *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop Dis* 13(8): e0007499. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>

- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeu M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol* 49: 2154-2160. doi: 10.1128/JCM.02452-10.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Renee Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG, Peacock SJ. (2013). A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis*. 7: e1954. doi: 10.1371/journal.pntd.0001954.
- Braga J, Hamond C, Martins G, Abreu RN, Lilenbaum W. (2011). Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 31: 147–150.
- Braselli A, Savio E, Purtscher H, eds. (1998). Enfermedades infecciosas. Publicación docente de la Cátedra y Servicio de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Higiene. Edición Librería Médica Editorial, Oficina del Libro, AEM, Montevideo.
- Breijo M, Servioli L, De León A, Mencía X, Piñeyrúa M, Zimalkovski N. (2006). Leptospirosis con compromiso respiratorio predominante. Presentación de cinco casos clínicos. *Rev Med Urug*. 22: 220-225.
- Caffarena RM, Agorio M, Barriola J. (1966). Comprobaciones serológicas de brucelosis y leptospirosis en suinos de la República Oriental del Uruguay. *An Fac Vet*. 11: 93-103.
- Caffarena RM, Cacchione RA, Cascelli ES, Martínez ES. (1971). Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol*. 9:186-194.
- Cameron CE. (2015). Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. Pp. 21-42 in: B. Adler (ed.) *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology* 387. DOI 10.1007/978-3-662-45059-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015.
- Céspedes Z, Manuel. (2005). Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22 (4), 290-307.
- Céspedes M, Tapia R, Balda L, Gonzalez D, Glenney M, Vinetz JM. (2009). Brote de leptospirosis asociado a la natación en una fuente de agua subterránea en una zona costera, Lima – Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*: 26: 441-448. ISSN1726-4634.
- Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, Caimi K, Vanasco B. (2016). Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol*. 37: 245-251. doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.033
- Chin VK, Lee TY, Lim WF, Wan Shahrman YWY, Syafinaz AN, Zamberi S, Maha A. (2018). Leptospirosis in humans: Biomarkers of host immune responses. *Microbiological Research* 207: 108–115. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.015.
- Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatar C, Chaval Y, Suput-tamongkol Y, Buchy P, Jittapalapong S, Herbreteau V, Morand S. (2014). Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 8: e2902. doi: 10.1371/journal.pntd.0002902.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9): e0003898 doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- da Cunha CE, Felix SR, Neto AC, Campello-Felix A, Kremer FS, Monte LG, Amaral MG, de Oliveira Nobre M, da Silva EF, Hartleben CP, McBride AJ, Dellagostin OA. (2016). Infection with *Leptospira kirschneri*

serovar Mozdok: first report from the southern hemisphere. *Am J Trop Med Hyg.* 94: 519-521. doi: 10.4269/ajtmh.15-0505.

de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG. (2008). Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 108:1-5. doi: 0.1016/j.actatropica.2008.07.005

Divers TJ, Chang YF, Irby NL, Smith JL, Carter CN. (2019). Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Veterinary Journal.* 51: 287–292.

Escandón-Vargas K, Osorio L, Astudillo-Hernández M. (2017). Seroprevalence and factors associated with *Leptospira* infection in an urban district of Cali, Colombia. *Cad Saúde Pública.* Jun 12; 33(5): e00039216. doi: 10.1590/0102-311X00039216.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (2000). *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999. Reprinted with corrections, May 2000. ISBN 0 9586326 0 X

Felix CR, Siedler BS, Barbosa LN, Timm GR, McFadden J, & Alan J. A. McBride AJA. (2019). An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives, *Expert Opinion on Drug Discovery*, DOI: 10.1080/17460441.2020.1694508

Fernandes LGV, Guaman LP, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Picardeau M, Nascimento ALTO. (2019). Gene silencing based on RNA-guided catalytically inactive Cas9 (dCas9): a new tool for genetic engineering in *Leptospira*. *Sci Rep.* 9(1): 1-14. doi: 10.1038/s41598-018-37949-x

Filippini M, del Monte A, Flores K, Parada D, Schelotto F, Hernández E, Soto R, Casales D, San Pedri L, Lobato L. (2002). Leptospirosis. Epidemiología y diagnóstico. Congreso Nacional de Medicina Interna, Montevideo. Comef, Caamepa, Instituto de Higiene.

Filippini M, Parada D, Schelotto F, Zampedri L, Lobato L. (2003). Leptospirosis. Epidemiología y diagnóstico. Florida. *Rev Méd Florida.* 1: 5-8.

Fischer BM, McMullen Jr. RJ, Reese S, Brehm W. (2019). Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results. *BMC Vet Res.* Jan 16;15(1): 29. doi: 10.1186/s12917-018-1722-7.

Fischer S, Mayer-Scholl A, Imholt C, Spierling NG, Heuser E, Schmidt S, Reil D, Rosenfeld UM, Jacob J, Nöckler K, Ulrich RG. (2018). *Leptospira* genomospecies and sequence type prevalence in small mammal populations in Germany. *Vector-borne ZoonotDis.* 18: 188-199. doi: 10.1089/vbz.2017.2140.

Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, Bulach D, Buschiazzi A, Chang YF, Galloway RL, Haake DA, Haft DH, Hartskeerl R, Ko AI, Levett PN, Matsunaga J, Mechaly AE, Monk JM, Nascimento AL, Nelson KE, Palsson B, Peacock SJ, Picardeau M, Ricaldi JN, Thaipandungpanit J, Wunder EA Jr, Yang XF, Zhang JJ, Vinetz JM. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb; 10(2): e0004403. doi: 10.1371/journal.pntd.0004403.

Galloway RL, Levett PN. (2010). Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4:e824. doi: 10.1371/journal.pntd.0000824.

García-González R, Reyes-Torres A, Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Rivas-Sánchez B, Velasco-Castrejón O. (2019). Genotyping of *Leptospira interrogans* isolates from Mexican patients *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 6; 61:e26. doi: 10.1590/S1678-9946201961026.

Garcia Masaya ML, Herrera Garcia ME, Perez Vasquez AM, Castillo Signor LC, Kestler

- Ordóñez RO. (2013). Seroprevalencia de leptospirosis humana en un asentamiento del área urbana de la ciudad de Guatemala. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 65: 166-176. <http://scielo.sld.cu>
- Geymonat JP. (2011). Evaluación de métodos de laboratorio para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias-Instituto de Higiene, UdelaR.
- Giefing-Kroll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstein B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*; Jun; 14(3): 309-321. doi: 10.1111/accel.12326.
- Gomes CK, Guedes M, Potula HH, Dellagostin OA, Gomes-Solecki M. (2018). Sex matters: male hamsters are more susceptible to lethal infection with lower doses of pathogenic *Leptospira* than female hamsters. *Infect Immun*. Sep 21;86(10):e00369-18. doi: 10.1128/IAI.00369-18.
- González S, del Monte A. (2008). *Leptospira*. En Algorta G y colaboradores: Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del Libro, FEFMUR, Montevideo.
- González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. (2013). Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 7: 941-945. DOI:<https://doi.org/10.3855/jidc.4110>.
- Goris MG, Kikken V, Straetemans M, Alba S, Goeijenbier M, van Gorp EC, Boer KR, Wagenaar JF, Hartskeerl RA. (2013). Towards the burden of human leptospirosis: duration of acute illness and occurrence of post-leptospirosis symptoms of patients in the Netherlands. *PLoS One*. 2013 Oct 3; 8(10): e76549. doi: 10.1371/journal.pone.0076549.
- Grillová L, Picardeau M. (2020). Core genome Multi-Locus Sequence Typing analyses of *Leptospira* spp. using the Bacterial Isolate Genome sequence database. *Methods Mol Biol*. 2134:11-21. doi: 10.1007/978-1-0716-0459-5_2.
- Grüne Löffler S, Rago V, Martínez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G, Brihuega B. (2015). Isolation of seawater tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PLoS ONE* 10(12): e0144974. doi:10.1371/journal.pone.0144974
- Grüne Löffler S, Martínez M, Romero G, Brihuega B. (2014). Test de aglutinación microscópica MAT. Pp 16-20 en: Manual: Curso teórico práctico de epidemiología y diagnóstico de leptospirosis. Argentina: Instituto de Patobiología INTA Castelar.
- Guernier V, Goarant C, Benschop J, Lau CL. (2018). A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Negl Trop Dis*. May 14; 12(5): e0006503. doi: 10.1371/journal.pntd.0006503
- Guerrier G, Hie P, Gourinat AC, Huguon E, Polfrit Y, Goarant C, D'Ortenzio E, Missotte I. (2013). Association between age and severity to leptospirosis in children. *PLoS Negl Trop Dis*. Sep 26; 7(9): e2436. doi: 10.1371/journal.pntd.0002436.
- Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Apr 26;13(4): e0007374. doi: 10.1371/journal.pntd.0007374.
- Haake DA, Levett PN, (2015). Leptospirosis in humans. Pp 65-97 in: B. Adler (ed.) *Leptospira and Leptospirosis*. Current Topics in Microbiology and Immunology 387. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.
- Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL (2004) Molecular evolution and

- mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 186: 2818–2828.
- Hamond C, Martins G, Lilenbaum W. (2012). Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. *Trop Anim Health Prod.* 44: 1927–1930.
- Hamond C, Pestana CP, Rocha-de-Souza CM, Cunha LE, Brandão FZ, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2015). Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. *Vet Microbiol.* 179: 264-269. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.06.014.
- Harrison NA, Fitzgerald WR (1988) Leptospirosis—can it be a sexually transmitted disease? *Postgrad Med J* 64:163–164.
- Hartskeerl RA, Goris MGA, Brem S, Meyer P, Kopp H, Gerhards H, Wollanke B. (2004). Classification of *Leptospira* from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis. *J Vet Med.* 51: 110–115. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00740.x>
- Hem S, Ly S, Votsi I, Vogt F, Asgari N, Buchy P, Heng S, Picardeau M, Sok T, Ly S, Huy R, Guillard B, Cauchemez S, Tarantola A. (2016). Estimating the burden of leptospirosis among febrile subjects aged below 20 years in Kampong Cham communities, Cambodia, 2007-2009. *PLoS One.* 2016;11:e0151555. doi: 10.1371/journal.pone.0151555. eCollection 2016.
- Hull-Jackson C, Glass MB, Ari MD, Bragg SL, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Levett PN. (2006). Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 44: 1853-1855. doi:10.1128/JCM.44.5.1853-1855. 2006.
- Ifran S. (2006). Cultivo de *Leptospira* y evaluación de un método de caracterización genética por RAPD-PCR: Amplificación al azar de ADN polimórfico. Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias-Instituto de Higiene, UdelaR.
- Iglesias T, Meny P, Menéndez C, Ashfield N, Quintero J, Schelotto F, Varela G. (2018). Comportamiento de un test inmunocromatográfico comercial para el diagnóstico de leptospirosis. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. ALAM, Santiago, Chile, Noviembre 2018.
- Instituto Nacional de Estadísticas/INE. Uruguay en cifras. [Citado febrero 15, 2011]. Disponible en: <http://www.ine.gub.uy>.
- Jaeger LH, Moreno LZ, Kremer FS, Dellagostin OA, Moreno AM, Lilenbaum W. (2019). Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa UC5/2011, a strain isolated after mare abortion: Implications for genital animal leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 64: 7-9. doi: 10.1016/j.cimid.2019.01.019.
- Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis.* 11: 1048-1054. doi: 10.3201/eid1107.041172.
- Jayakrishnan B, Ben Abid F, Balkhair A, Alkaabi JK, Al-Rawas OA, George J, Al-Zeedy K. (2013). Severe Pulmonary Involvement in Leptospirosis: Alternate antibiotics and systemic steroids. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 13: 318-322. DOI:10.12816/0003241 PMID: 23862041.
- Katellaris AL, Glasgow K, Lawrence K, Corben P, Zheng A, Sumithra S, Turahui J, Terry J, van den Berg D, Hennessy D, Kane S, Craig SB, Heading E, Burns M-A, Corner HL, Sheppard V, McNulty J. (2020). Investigation and response to an outbreak of leptospirosis among raspberry workers in Australia, 2018. *Zoonoses Public Health.* 67: 35-43. doi: 10.1111/zph.12652.
- Katz KN, Ananin, VV. (1971). Leptospirosis humana y animal. Moscú: Ed. Medicina; 1971, pág 16-40.

Khurana SK, Dhama K, Minakshi P, Gulati B, Malik YS, Karthik K. (2016). Leptospirosis in horses: special reference to equine recurrent uveitis. *J Exp Biol Agric Sci JEBAS.4 (Spl-4-EHIDZ): S123-131*. DOI: [http://dx.doi.org/10.18006/2016.4\(Spl-4-EHIDZ\).S123.S131](http://dx.doi.org/10.18006/2016.4(Spl-4-EHIDZ).S123.S131)

KIT Biomedical Centre, Leptospirosis Reference Centre: Typing with monoclonal antibodies. <http://www.kit.nl/biomedical-research/leptospirosis-reference-centre>.

Klein SL, Roberts CW, Editors. (2010). *Sex Hormones and Immunity to Infection*. DOI: 10.1007/978-3-642-02155-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Levett PN. (2015). Systematics of *Leptospiraceae*. Pp 11-20 in in: B. Adler (ed.) *Leptospira* and Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Lilenbaum W, Martins G. (2014). Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound Emerg Dis*. 61 Suppl 1: 63-68. doi: 10.1111/tbed.12233.

Loan HK, Van Cuong N, Takhampunya R, Kiet BT, Campbell J, Them LN, Bryant JE, Tippayachai B, Van Hoang N, Morand S, Hien VB, Carrique-Mas JJ. (2015). How important are rats as vectors of Leptospirosis in the Mekong delta of Vietnam? *Vector-borne and Zoonotic Diseases*.15: 56-64. doi: 10.1089/vbz.2014.1613

Lombardi R, Varela de Sandler A, Witkind J, Petruccielli D, Campalans LA. (1972). Insuficiencia renal aguda en la Leptospirosis. *Rev Urug Patol Clin Microbiol*. 10: 28-36.

Lombardi R. (1997). Acute renal failure in leptospirosis in Uruguay. *Renal Fail*. 19: 315-318. doi: 10.3109/08860229709026295.

Loureiro AP, Lilenbaum W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease *Theriogenology*;141: 41-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011.

Loureiro AP, Jaeger LH, Di Azevedo MIN, Miraglia F, Moreno LZ, Andrea M Moreno AM, Pestana CP, Carvalho-Costa FA, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2020). Molecular epidemiology of *Leptospira noguchii* reveals important insights into a One Health context. *Transbound Emerg Dis*. 67(1): 276-283. doi: 10.1111/tbed.13349.

Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C. (2016). Distribution and diversity of pathogenic *Leptospira* species in peri-domestic surface waters from south central Chile. *PLoS Negl Trop Dis*.10:e0004895. doi: 10.1371/journal.pntd.0004895.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Vidal Ore C, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. (2008). Human Leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2;2: e213. doi: 10.1371/journal.pntd.0000213.

Maze MJ, Sharples KJ, Allan KJ, Rubach MP, Crump JA. (2019) Diagnostic accuracy of leptospirosis whole-cell lateral flow assays: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*.25: 437-444. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.014.

Meny P, Hernández E, Schelotto F, Varela G. (2014). Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IFI-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. *Rev. Méd. Urug*. 30: 88-92.

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. (2017). Characterization of *Leptospira*

isolates from humans and the environment in Uruguay
Rev Inst Med Trop Sao Paulo. Dec 21; 59:e79. doi: 10.1590/S1678-9946201759079.

Meny P, Menéndez C, Ashfield N, Quintero J, Rios C, Iglesias T, Schelotto F, Varela G. (2019). Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. Rev Argent Microbiol. 51: 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.005>

Mgode GF, Mhamphi GG, Katkweba AS, Thomas M. (2014). *Leptospira* infections in freshwater fish in Morogoro, Tanzania: a hidden public health threat. Tanzan J Health Res. 16: 112-117. doi: 10.4314/thrb.v16i2.7.

Mgode GF, Machang'u RS, Mhamphi GG, Katakweba A, Mulungu LS, Durnez L, Leirs H, Hartskeerl RA, Belmainet SR. (2015). *Leptospira* serovars for diagnosis of leptospirosis in humans and animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates and Reservoir Hosts. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(12): e0004251. doi:10.1371/journal.pntd.0004251.

Miraglia F, de Moraes ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Zacarias FGS, Delbem AC, Ferreira TSP, Souza GO, Hartskeerl RA, Vasconcellos SA, Moreno AM. (2012). Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. Trop Anim Health Prod. 45: 117–121. doi: 10.1007/s11250-012-0181-6.

Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW. (2002). Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. Clin Infect Dis. 34:1593–1599.

Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, Schneider MC. (2020). A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. Rev Panam Salud Pública. 44:e78. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.78>.

Murray CK, Gray MR, Mende K, Parker TM, Samir A, Rahman BA, Habashy EE, Hospenthal DR, Pimentel G (2011). Use of patient-specific *Leptospira* isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). Trans R Soc Trop Med Hyg. 105:209–213. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.12.004.

Nagel A, Vázquez CL, Etulain J, Blanco FC, Gravisaco MJ, Gómez RM, Caimi K. (2019). Bovine macrophages responses to the infection with virulent and attenuated *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Vet Microbiol. 233: 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.033>

Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Thinkamrop B. (2002). Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. Int J Infect Dis. 6: 52-59. doi: 10.1016/s1201-9712(02)90137-2.

Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. (2003). Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. Clin Infect Dis. 36:1507-1513. doi: 10.1086/375226.

Pappachan MJ, Mathew S, Aravindan KP, Khader A, Bharghavan PV, Kareem MM, Tuteja U, Shukla J, Batra HV (2004) Risk factors for mortality in patients with leptospirosis during an epidemic in northern Kerala. Natl Med J India 17:240–242.

Parveen SMA, Suganyaa B, Sathya MS, Margreat AAP, SivasankariK, Shanmughapriya S, Natarajaseenivasan K, Hoffman NE. (2016). Leptospirosis seroprevalence among blue metal mine workers of Tamil Nadu, India. Am J Trop Med Hyg. 95: 38-42. doi: 10.4269/ajtmh.16-0095.

Pedraza AM, Salamanca EE, Ramirez RY, Ospina JM, Pulido MO. (2012). Serum prevalence of anti-*Leptospira* antibodies in workers from animal sacrifice centers in Boyaca, Colombia.

Infectio. 16: 31-36.

Peláez-Sánchez RG, Lopez JA, Pereira MM, Naranjo MA, Agudelo-Flórez P. (2016). Genetic diversity of *Leptospira* in northwestern Colombia: first report of *Leptospira santarosai* as a recognised leptospirosis agent. Mem Inst Oswaldo Cruz. 111: 737-744. doi: 10.1590/0074-02760160245

Pereira MM, Matsuo MG, Bauab AR, Vasconcelos SA, Moraes ZM, Baranton G, Saint Girons I. (2000). A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of Leptospirosis outbreaks in Brazil. J Clin Microbiol. 38: 450-452. PMC88748 PMID 10618140

Perez J, Goarant C. (2010) Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol 10: 325. doi: 10.1186/1471-2180-10-325

Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. (2014). Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). Int J Environ Res Public Health. 11: 10770-10789. doi:10.3390/ijerph111010770

Picardeau M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat Rev Microbiol. 15: 297–307. doi:10.1038/nrmicro.2017.5

Pinto PS, Libonati H, Lilenbaum W. (2017). A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. Trop Anim Health Prod. 49: 231–238. DOI 10.1007/s11250-016-1201-8

Pisano I, Marra A, Pomi A, Boero A. (1997). Leptospirosis con compromiso miocárdico. Cuad Med Interna. 1: 51-55.

Postic D, Riquelme-Sertour N, Mérien F, Perolat P, Baranton G. (2000). Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. Res Microbiol. 151: 333-341. doi: 10.1016/s0923-2508(00)00156-x.

Pradutkanchana S, Pradutkanchana J, Khuntikij P. (2003). Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. J Med Assoc Thai. 86: 641-646.

Puentes R, Hernández E, Franco G, Cattáneo M, Furtado A, Rosadilla D, Bermúdez J. (2011). Anticuerpos anti *Leptospira* en bovinos de pequeños productores lecheros de Uruguay. En: XV Congreso Latinoamericano de Buiatría. 150411. Paysandú, Uruguay.

Reller ME, Wunder EA Jr, Miles JJ, Flom JE, Mayorga O, Woods CW, Ko AI, Dumler JS, Matute AJ. (2014). Unsuspected leptospirosis is a cause of acute febrile illness in Nicaragua. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2941. doi: 10.1371/journal.pntd.0002941.

Repiso MV, Gil A, Bañales PM, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 40 (157): 5-28.

Ricardo T, Jacob P, Chiani Y, Schmeling MF, Cornejo P, Ojeda AA, Teta PV, Vanasco NB, Previtali MA. (2020) Seroprevalence of leptospiral antibodies in rodents from riverside communities of Santa Fe, Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 2020 Apr 24; 14(4):e0008222. doi: 10.1371/journal.pntd.0008222.

Rosa MI, Reis MFD, Simon C, Dondossola E, Alexandre MC, Colonetti T, Meller FO. (2017). IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Cien Saude Colet. 22: 4001-4012. doi: 10.1590/1413-812320172212.14112016.

Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. (2006). Application of MultiLocus Variable-number tandem-repeat Analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J Clin Microbiol.44: 3954-

3962. doi: 10.1128/JCM.00336-06.

Schelotto F, Hernández E, González S, del Monte A, Ifrán S, Flores K, Pardo L, Parada D, Filippini M, Balseiro V, Geymonat JP, Varela G. (2012). A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 54: 69-75. doi: 10.1590 /S0036-46652012000200003

Schelotto F, Hernández E, Varela G, Del Monte A, Meny P, González S, Ifrán S, Flores K, Pardo L, Filippini M, Parada D, Geymonat JP. (2013). Leptospirosis humana como zoonosis y su control. En publicación académica "Leptospirosis", compilación de presentaciones en reunión conjunta de Academias Nacionales de Medicina y Veterinaria, paraninfo UdelaR, 2013. Editorial Ligom, Montevideo.

Schneider AG, Casanovas-Massana A, Hacker KP, Wunder EA Jr, Begon M, Reis MG, Childs JE, Costa F, Lindow JC, Ko AI. (2018). Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop Dis*. Apr 6;12(4):e0006415. doi:10.1371/journal.pntd.0006415.

Schneider MC, Leonel DG, Hamrick PN, de Caldas EP, Velásquez RT, Mendigaña Paez FA, González Arrebato JC, Genger A, Maria Pereira M, Aldighieri S. (2017). Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data. *Rev Panam Salud Pública*. Jun 19; 41:e81. doi: 10.26633/RPSP.2017.81.

Schurz H, Salie M, Tromp G, Hoal EG, Kinnear CJ, Moller M. (2019). The X chromosome and sex specific effects in infectious disease susceptibility. *Human genomics* 13:2. doi: 10.1186/s40246-018-0185-z.

Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J, Gallicchio O. (2010). Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 42:126-128. DOI:10.1590/S0325-75412010000200012

Silva EF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanzio DA, Pinto LS, Queiroz A, Ko AI, Brod CS, Odir A Dellagostin OA. (2009). *Leptospira noguchii* and human and animal Leptospirosis, southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 15: 621-623. DOI:10.3201/eid1504.071669

Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes MLC, Linhares AC, Vasconcelos PF, Ko AI. (2002). Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* in children of Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 35:159-165. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037.86822002000200006>

Siqueira CC, Fraga DBM, Chagas-Jr. AD, Athanzio DA, Silva MMN, Cerqueira RB, McBride FWdaC, Pinna MH, Ayres MCC. (2020). Seroprevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in the metropolitan region of Salvador and Recôncavo Baiano region, Bahia state (NE Brazil). *Trop Anim Health Prod*. 52: 31-39. doi: 10.1007/s11250-019-01956-5.

Smith S, Liu YH, Carter A, Kennedy BJ, Dermedoglou A, Poulgrain SS, Paavola MP, Minto TL, Luc M, Hanson J. (2019). Severe leptospirosis in tropical Australia: Optimising intensive care unit management to reduce mortality. *PLoS Negl Trop Dis*. Dec 2; 13(12): e0007929. doi: 10.1371/journal.pntd.0007929.

Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwattanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP, Peacock SJ. (2009). The Microscopic Agglutination Test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 81: 695-697. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0252.

Soares PM, Gomes DO, Macedo FP, Soares MM, Lemes KR, Jaeger LH, Lilenbaum W, Lima AMC. (2019-2020). Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in Brazil. *Microb Pathog*. 138:103803. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103803.

- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247-255. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014.
- Suepaul SM, Carrington CVF, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. (2010). Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect.* 138: 1059-1070. doi: 10.1017/S0950268809990902.
- Tarantola A, Goarant C. (2018). Leptospirosis in french historical medical literature: Weil's Disease or Kelsch's Disease? *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99(6): 1366-1368. doi: 10.4269/ajtmh.18-0629.
- Tealdo MS, Romero GN, Autrey CD, Samartino L. (2007). Serología positiva a *Leptospira interrogans*, serovar Cynopteri en caninos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *InVet.* 9:59-65
- Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpaboon R, Hoffmaster AR, Day NP, Peacock SJ. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and LipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS ONE* 6: e16236. doi: 10.1371/journal.pone.0016236.
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Picardeau M, Goarant C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom* 2018; Jan; 4(1):e000144. doi: 10.1099/mgen.0.000144.
- Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert M-E, Rettinger A, Douyère A, Meyer M, Iraola G, Picardeau M, Goarant C (2018). Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis. *Front. Microbiol.* 2018. 9 (May):1-14. doi:10.3389/fmicb.2018.00816.
- Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. (2002). Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect.*; 128: 29-36. DOI:10.1017/s0950268801006392
- Timoney JF, Kalimuthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC, Fettingner M. (2011). A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki is associated with equine abortion. *Vet Microbiol.* 150: 349–353.
- Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martínez-Silveira MS, Goris MGA, Stein C, Ko AI, Abela-Ridder B. (2015). Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 9 (10): e0004122. doi:10.1371/ journal.pntd.0004122
- Torten M, Shenberg E, Van der Hoeden J. (1966). The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *J Infect Dis.* 166: 537-543. doi: 10.1093/infdis/ 116.5.537.
- Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol.* 7: 35-40.
- Ursu M, Lombardi R. (1993). Insuficiencia renal aguda en la leptospirosis: análisis de 20 casos. *Paciente Crít.* 6: 129-35.
- Vanasco NB, Stiefel ML, Varela Erniaga S, Fritschy BA. (2005). Brote de leptospirosis humana: análisis espacial de casos y variedades de leptospirosis. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica.* Marzo 15.
- Verma A, Stevenson B. (2012). Leptospiral uveitis – there is more to it than meets the eye! *Zoonoses Public Health.* 59: 132 – 141. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01445.x>
- Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M. Human leptospirosis in Portugal. (2006). A retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis.* 10: 378-386. doi: 10.1016/j.ijid.2005.07.006.
- Wagenaar JF, Goris MG, Partiningrum DL, Isbandrio B, Hartskeerl RA, Brandjes DP, Meijers JC, Gasem

MH, van Gorp EC. (2010). Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Trop Med Int Health*. 15: 152–159. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02434.x.

Weyant R S, Bragg S L, Kaufmann A F. (2002). *Leptospira* and *Leptonema*. Cap 52, págs 739-745 en: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Ed. ASM, Washington DC.

WHO-ILS (International Leptospirosis Society). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Terpstra WJ, Editor. Malta, WHO, 2003.

Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF, Slack AT, Limpaboon R, Suputtamongkol Y, White NJ, Day NPJ, Peacock SJ. (2007). Optimization of culture of *Leptospira* from humans with Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 45: 1363–1365. doi: 10.1128/JCM.02430-06.

Xu Y, Ye Q. (2018). Human leptospirosis vaccines in China. *Hum Vaccin Immunother*.14: 984-993. doi:10.1080/21645515.2017.1405884

Yersin C, Bovet P, Mérien F, Clement J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P. (2000). Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 94: 71–76. doi: 10.1016/s0035-9203(00)90445-0.

Zaki SA, Shanbag P. (2010). Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. *Infection* 38, 285–291. doi: 10.1007/s15010-010-0030-3.

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, Macias-Rioseco M, Menendez C, Mortola A, Picardeau M, Quintero J, Rios C, Rodriguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto F, Riet-Correa F, Buschiazzo A. On behalf of the Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospirosis (Consortium) (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(9): e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>.

Zuerner RL. (2005). Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol*. 2005 Oct; Chapter 12:Unit 12E.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc12e01s00.

Zuerner RL. Host response to *Leptospira* infection. Immune pathology. (2015) In: Adler B, editor. *Leptospira* and leptospirosis (Current topics in microbiology and immunology), vol. 387. Heidelberg, Germany: Springer; p. 239.